

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**BIOLOGICKÁ AKTIVITA SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ ROSTLIN VII.
ALKALOIDY *VINCA MINOR* L.**

Vedoucí diplomové práce: Ing. Miroslav Ločárek
Vedoucí katedry: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, PhD.

Hradec Králové, 2018

Lucie Marečková

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY

DIPLOMA THESIS

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF SECONDARY PLANTS METABOLITES VII.
ALKALOIDS OF *VINCA MINOR L.***

Supervisor: Ing. Miroslav Ločárek

Head of Department: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, PhD.

Hradec Kralove, 2018

Lucie Marečková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto velmi děkuji vedoucímu diplomové práce panu Ing. Miroslavu Ločárkovi za pomoc při zpracování mé diplomové práce, věnovaný čas, odborné vedení a poskytnuté rady a materiály. Dále bych ráda poděkovala panu Prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi CSc. za naměření inhibičních aktivit, panu doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi CSc. za změření a interpretaci NMR spekter a celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vstřícnost a vytvoření příjemné atmosféry na pracovišti.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Tato práce byla zpracována za podpory projektu SVV 260 292.

V Hradci Králové, 2018

Lucie Marečková

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Cíl práce.....	10
3	Teoretická část	11
3.1	Demence.....	11
3.2	Alzheimerova choroba.....	11
3.2.1	Makroskopické změny	12
3.2.2	Etiologie.....	13
3.2.3	Farmakoterapie	18
3.3	<i>Vinca minor L.</i>	25
3.3.1	Čeleď <i>Apocynaceae</i>	25
3.3.2	Rod <i>Vinca</i>	26
3.3.3	<i>Vinca minor L.</i>	28
3.3.4	<i>Catharanthus roseus L.</i>	38
4	Experimentální část.....	40
4.1	Všeobecné postupy	40
4.1.1	Příprava rozpouštědel.....	40
4.1.2	Příprava litých desek.....	40
4.1.3	Odpařování extraktů.....	40
4.1.4	Detekce alkaloidů.....	40
4.1.5	Sloupcová chromatografie.....	41
4.1.6	Tenkvrstvá chromatografie	41
4.2	Potřeby a chemikálie pro izolaci alkaloidů	41
4.2.1	Rozpouštědla	41
4.2.2	Chemikálie	41

4.2.3	Detekční činidla	42
4.2.4	Chromatografické adsorbenty	42
4.2.5	Vyvíjecí soustavy pro TLC izolaci alkaloidů.....	42
4.2.6	Přístroje	42
4.3	Velká extrakce <i>Vinca minor L.</i>	43
4.3.1	Příprava základního extraktu a chloroformového výtřepku	43
4.3.2	Příprava předčištěného chloroformového výtřepku	43
4.3.3	Chromatografie předčištěného chloroformového výtřepku	45
4.4	Izolace jednotlivých alkaloidů	47
4.5	GC/MS analýza a identifikace alkaloidů.....	48
4.6	Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity alkaloidů.....	49
4.6.1	Materiál a chemikálie	49
4.6.2	Příprava hemolyzátu lidských erytrocytů a plazmy.....	51
4.6.3	Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC ₅₀)	51
5	Výsledky.....	53
5.1	Identifikace látky LM-5.1.2.....	53
5.1.1	GC/MS analýza LM-5.1.2	53
5.1.2	NMR analýza látky 5.2.....	54
5.2	Identifikace látky LM-5.2	55
5.2.1	NMR analýza látky LM-5.2.....	56
5.3	Stanovení inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů	57
6	Diskuse	58
7	Seznam použité literatury.....	59

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AChE	acetylcholinesterasa
ApoE	apolipoprotein E
APP14	abnormal precursor protein 14
ATP	adenosintrifosfát
BuChE	butyrylcholinesterasa
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GC/MS	plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie
IKK	I κ B kinasa
NIST 11	National institut of Standards and Technology Library
NMDA	N-methyl-D-aspartátové receptory
PDE1	fosfodiesterasa-1
PSEN1	presenilin-1
PSEN2	presenilin-2

1 Úvod

Světová populace stárne. Rozvoj vědy a zdravotní péče přispěly k tomu, že lidé žijí zdravěji a déle. To však také vedlo k nárůstu incidence onemocnění, která se vyskytují především v pozdějším věku, mezi které patří právě i demence.[1]

Současné odhady naznačují, že po celém světě žije 47 milionů lidí s demencí a toto číslo se bude i nadále zvyšovat, pokud nedojde k revoluci ve farmakoterapii tohoto onemocnění. Demence nepostihuje pouze jednotlivce, nýbrž i členy rodiny, kteří tak mnohdy žijí na hranici chudoby.[1]

Demence je syndrom způsobený onemocněním mozku a dochází i k narušení jeho funkcí, včetně paměti, myšlení, orientace, schopnosti učit se a dalších. Alzheimerova choroba je nejběžnější příčinou demence, mimo dalších forem, kterými jsou vaskulární a frontotemporální demence. Doposud používaná léčiva v terapii Alzheimerovy choroby neřeší hlavní příčiny neurodegenerace, ale poskytují pouze dočasnou úlevu od příznaků a oddalují progresi onemocnění. Existují dvě základní cesty pro léčbu Alzheimerovy choroby a to použití inhibitorů AChE nebo inhibitorů NMDA receptorů.[1][2]

Proto je potřeba dále hledat nová léčiva, která budou schopna nemoc vyléčit, a tak má Alzheimerova choroba ve výzkumu stále své místo. Výzkumná skupina ADINACO (Alzheimer's Disease and NATural COMpounds), která působí na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, se zabývá širším studiem látek izolovaných z rostlin i hub z hlediska jejich působení na patofyziologické procesy ovlivňující vývoj Alzheimerovy choroby. Skupina provádí izolaci a identifikaci látek, následně se stanovuje jejich biologická aktivita vhodnou metodou.[3]

Apocynaceae je čeleď bohatá na druhy, které se ve velké míře uplatnily v medicíně. Řadíme sem mimo jiné i rostlinu *Catharanthus roseus L.* v minulosti hojně využívanou jako antidiabetikum. Tento účinek však nebyl nikdy ověřen, ale během studie antidiabetických účinků této rostliny, bylo objeveno její antimitotické působení. Rostlina, která je bohatá na indolové alkaloidy (vinblastin, vinkristin) se používá k izolaci těchto alkaloidů mající široké uplatnění v onkologii.[4]

Dále sem řadíme rostlinu *Vinca minor L.*, která je předmětem této diplomové práce. Jedná se o stále zelenou rostlinu bohatou na indolové alkaloidy, z nichž je nejvíce

používán vinkamin a především jeho semisyntetický derivát vinpocetin, který se používá v prevenci a léčbě cerebrovaskulárních onemocnění.[5]

V současné době se alkaloidům *Vinca minor L.* věnuje pozornost a je zkoumán jejich potenciální účinek na AChE a BuChE a jejich případné využití v léčbě Alzheimerovy choroby.

2 Cíl práce

1. Izolace alkaloidů z vybrané frakce sumárního alkaloidního extraktu *Vinca minor* L. za použití chromatografických metod
2. Identifikace alkaloidů a určení jejich struktury pomocí GC/MS analýzy
3. Stanovení biologické aktivity získaných alkaloidů na lidskou acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu
4. Vypracování literární rešerše

3 Teoretická část

3.1 Demence

Demence je syndrom získaných a setrvávajících duševních poruch, které jsou charakterizovány zhoršením v alespoň třech následujících oblastech: paměť, myšlení, jazyk, plánování, manipulace se získanými znalostmi. Dle této definice sem nepatří mentální retardace ani akutní stavy zmatenosti. Většina forem demence se objevuje po 65. roce života, asi 5 % populace starší 65 let je postiženo demencí, u lidí nad 80 let prevalence stoupá až k 20 %.[6] Celosvětově je demencí postiženo přes 47 milionů lidí a počet takových případů se neustále navyšuje.[7] Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou demence, až z 60%. Dalšími typy demence jsou například vaskulární demence, demence s Lewyho tělísky nebo frontotemporální demence.[8]

Člověk, u kterého diagnostikujeme demenci, může mít dle [8] následující příznaky.

- a) Ztráta paměti, která ovlivňuje schopnost plnit běžné pracovní úkony
- b) Problémy s vykonáním běžných činností
- c) Problémy s řečí – člověk zapomíná i jednoduchá slova nebo je nahrazuje nesprávnými, a jeho věty pak nedávají smysl
- d) Časová a místní desorientace
- e) Problém s abstraktním myšlením
- f) Zakládání věcí na nesprávné místo
- g) Změny v náladě nebo chování
- h) Ztráta iniciativy

3.2 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba byla poprvé popsána německým neuropatologem Aloisem Alzheimerem roku 1906, po kterém tato choroba později získává své jméno.[9] Projevuje se progresivní ztrátou paměti a dalších kognitivních schopností. Nejvíce je postižena krátkodobá paměť. I přesto, že najdeme vzácné případy v dřívějším věku, jedná se o chorobu objevující se spíše ve stáří a s postupujícím věkem počet případů roste.

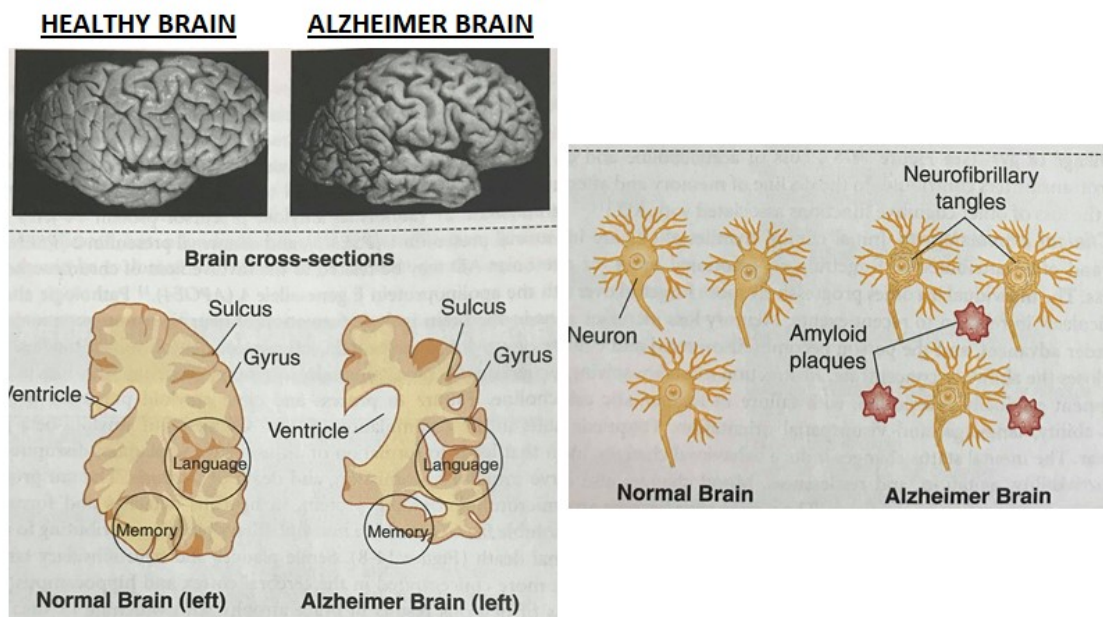
Onemocnění s časným začátkem před 65. rokem bývá familiárně dědičné (s autozomálně dominantním typem dědičnosti). U nemocných nad 65 let může být sporadické i dědičné.

Nemoc často začíná mírnými symptomy, které se zhoršují různou rychlostí, a končí vážným poškozením mozku. Skutečné příčiny, které hrají důležitou roli v rozvoji Alzheimerovy choroby, doposud nejsou přesně definovány, ale některé anomálie hrají důležitou úlohu v patogenezi Alzheimerovy choroby. Jsou to abnormální energetický metabolismus a zpracování proteinů, tj. agregace β amyloidu, fosforylace tau proteinu, změny v metabolismu vápníku, oxidativní stres a neuro-zánět. [7][10] Jedním z hlavních míst, kde se koncentrují obecně hlavní znaky Alzheimerovy choroby je hipokampus. Většinou je Alzheimerova choroba diagnostikována až tehdy, kdy je hipokampus značně poškozen.[11]

3.2.1 Makroskopické změny

Při Alzheimerově chorobě probíhají podobné změny jako při stárnutí. Obecně se hmotnost i velikost mozku stářím snižuje, zejména po 55. roce života. Redukuje se tloušťka kůry mozkové, rozšiřují se mozkové komory, v období mezi 20. – 50. rokem života relativně rychleji ubývá šedá hmota, v pozdějším období hmota bílá.

Mozek pacientů s Alzheimerovou chorobou je bledý a atrofický s poklesem hmotnosti z 1300 – 1700 g na 800 – 1000 g. Atrofie nejvíce postihuje frontální, temporální a parietální lalok. Ranná Alzheimerova choroba ovlivňuje strukturálně hipokampální oblasti, zatímco funkčně ovlivňuje parietální laloky, což může být způsobeno amyloidními depozity a odpojením od hipokampu. Změny jsou ale viditelné v celém mozku – závity jsou zúžené a rýhy rozšířené, můžeme vidět fibrózu leptomeningů a zvětšení mozkových komor v důsledku ztráty parenchymu. Existují ale i atypické případy, kde jsou změny omezeny pouze na jeden mozkový lalok nebo hemisféru. [10][12][13]



Obr. č. 1: Běžné patologické nálezy u Alzheimerovy choroby [14]

3.2.2 Etiologie

Přesná příčina vzniku Alzheimerovy choroby není dosud známa. Časný nástup familiární Alzheimerovy choroby je připisován třem genům s mutací na chromosomu 21 abnormal amyloid precursor protein 14 (APP14), abnormální presenilin-1 (PSEN1) a abnormální presenilin-2 (PSEN2). Pozdní Alzheimerova choroba je spojována s chromosomem 19, genem pro apolipoprotein E (APOE4).

Patologické změny v mozku zahrnují tvorbu senilních plaků, neurofibrilárních spletej a degeneraci cholinergních neuronů s nedostatkem acetylcholinu.[14]

3.2.2.1 Senilní plaky

Senilní plaky se v malém počtu vyskytují i v průběhu klinicky normálního stárnutí mozku, naproti tomu u Alzheimerovy choroby je jejich počet zdatelně vyšší. Proto jejich přítomnost nemusí zákonitě znamenat poruchu kognitivních funkcí, ale jejich zvýšená koncentrace je známkou Alzheimerovy choroby. Další nemocí související s depozity amyloidu je Downův syndrom. Senilní plaky můžeme pozorovat v meziprostoru mezi

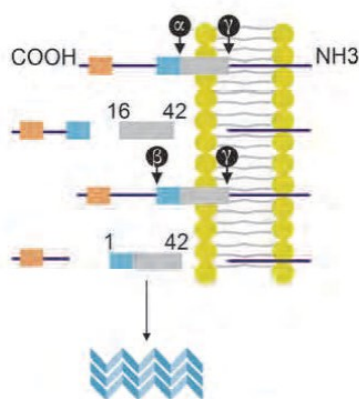
neurony, jsou relativně vzácné v limbickém systému a neokortexu, naproti tomu dobře viditelné ve fronto-temporální a okcipitální oblasti.

Měří mezi 20 a 100 mikrony a tvoří je jádro, jehož hlavní složkou je beta amyloid (β A). Toto jádro je obklopeno deformovanými dendrity a axony (neurity), aktivovanými mikroglia a astrocyty. Dalšími komponenty, které se podílejí na tvorbě senilních plaků, jsou např. alfa-synuklein (hlavní neamyloidní složka), alfa-1-antichymotrypsin, alfa-2-makroglobulin, apolipoprotein E, ubikvitin a preseniliny.

Podle jejich vzhledu rozlišujeme plaky do několika morfologických podtypů. Nejreprezentativnějším podtypem je **klasický** zralý plak, často označovaný také jako neuritický plak, kde je již relativně ohraničené husté amyloidní jádro. Dalším klíčovým podtypem je plak **difúzní**, který má neostře ohraničené jádro, a postrádá imunitní odpověď glií. Jednotlivé formy představují zároveň i jakási vývojová stádia senilních plaků. Nejprve dochází k akumulaci beta amyloidu, který je následně organizován a vystaven imunitní odpovědi.[12]

3.2.2.1.1 Metabolismus β -Amyloidu

Amyloid beta je tvořen enzymatickým štěpením amyloid prekurzorového proteinu APP, mající N-terminální a C-terminální konec. Štěpením alfa a gama sekretázou je získán peptid 16-42, který je solubilní a snadno degradovatelný. Štěpením beta a gama sekretázou je získán peptid 1-42, který je v konformaci skládaného listu a velmi špatně degradovatelný. APP je tedy metabolizován neamyloidogenní nebo amyloidogenní cestou.



Obr. č. 2: Vznik β -amyloidu [12]

Za normálních podmínek je APP štěpen enzymem α -sekretázou, kdy vzniká rozpustný N-terminální a C-terminální fragment, vysoce rozpustný beta amyloid o 16 aminokyselinách. Produkty této reakce působí neuroprotektivně. Jedná se o neamyloidogenní metabolickou cestu.

Naproti tomu může být APP štěpeno β -sekretázou a γ -sekretázou. APP je štěpeno β -sekretázou blíže k N-konci, vzniká tak delší C-terminální fragment, než v případě štěpení α -sekretázou. Delší C-terminální konec je následně štěpen γ -sekretázou na fragmenty o délce 37 – 42 AMK. Takto vzniklý beta amyloid není rozpustný, shlukuje se a hromadí v extracelulárním prostoru mozku ve formě amyloidních plaků. Amyloidní plaky poté mohou narušit komunikaci mezi neurony nebo vyvolat imunitní zánětlivou reakci.[12]

3.2.2.2 Neurofibrilární spleti

Neurofibrilární klubka jsou Alzheimerovým objevem, vypadají jako chumáče hrubších vláken, které prostupují cytoplazmou neuronu. Jejich počet a prostorová distribuce úzce souvisí s kognitivní funkcí a progresí Alzheimerovy choroby. Hlavní složkou je prokazatelně protein tau, který patří do skupiny MAP – microtubule associated protein.

Nízkomolekulární protein tau, tedy v defosforylovaném nebo částečně fosforylovaném stavu, je asociovaný s mikrotubuly. Nachází se především v axonech (z malé části i v dendritech), kde se váže na tubulin mikrotubulů, startuje jejich polymerizaci, a podílí se na pohybu a transportu buněk.

Za patologických podmínek je tau protein hyperfosforylován – má vyšší molekulovou hmotnost, což způsobuje jeho zrychlenou samoagregaci. U Alzheimerovy choroby se hyperfosforylovaný tau protein shlukuje do helikálních vláken, které brání axonálnímu přenosu a v konečném stádiu způsobuje apoptotickou neurodegeneraci.[12]

Bylo dokázáno, že tau protein hraje také důležitou roli v ochraně neuronální DNA a mimo jiné i jeho změny ve struktuře zapříčiňují oxidativní poškození, které se vyskytuje u Alzheimerovy choroby.[15]

3.2.2.3 Cholinerní transmise

Správná funkce cholinerního systému je velmi důležitá pro paměťové funkce a vědomí. Cholinerní systém je zodpovědný za ukládání a vyhledávání položek v paměti a míra jeho poškození koreluje s poruchou kognitivních funkcí a paměti.[16] U pacientů s Alzheimerovou chorobou znatelně ubývají cholinerní neurony, postižen je především presynaptický oddíl neuronu, přesto však zůstává schopnost syntézy a uvolnění acetylcholinu do jisté míry zachována.[13]

Mimo jiné se také snižuje aktivita cholinacetyltransferasy, enzymu, který je zodpovědný za syntézu acetylcholinu z acetyl CoA a cholinu. Po uvolnění z presynaptické části neuronu se váže na presynapticky nebo postsynapticky uložené muskarinové nebo nikotinové receptory. U Alzheimerovy choroby je počet muskarinových receptorů relativně zachovalý, značná je ale ztráta nikotinových receptorů.

Acetylcholin je posléze odbouráván enzymy patřící mezi cholinesterasy, především acetylcholinesterasou a v menší míře butyrylcholinesterasou. U Alzheimerovy choroby se množství butyrylcholinesterasy neúměrně zvyšuje.[17][18]

3.2.2.4 Mozková inzulinová rezistence

Inzulín v mozku hraje důležitou roli v regulaci metabolismu a změny v jeho aktivitě přímo souvisejí se vznikem metabolických onemocnění. Souvislost mezi Alzheimerovou chorobou a inzulinem v mozku byla v poledních letech rozsáhle zkoumána. Epidemiologické studie silně naznačují, že diabetes mellitus je rizikovým faktorem pro Alzheimerovu chorobu. U osob s inzulinovou rezistencí a kognitivním poškozením dochází k snížení rychlosti využití glukosy v mozku, což naznačuje, že inzulinová rezistence může být brána jako počáteční marker Alzheimerovy choroby. Přítomnost inzulinových receptorů ve specifických oblastech mozku, zvláště v hipokampu a mediálním temporálním kortexu, dokazuje, že inzulín je zapojený do procesů paměti. V základě inzulinová signalizace reguluje přežití neuronů, neurotransmisi a synaptické aktivity. Inzulín také reguluje hlavní mechanismy, které se podílejí na učení a paměti.[12][19]

3.2.2.5 Cévní změny

Přes 80 % pacientů s Alzheimerovou chorobou je postiženo mozkovou amyloidní angiopatií, která způsobuje deformaci mozkových cév, především kapilár, a narušení endotelu depozity amyloidu a kolagenem, který je spojen s následnou imunitní odpovědí. Postižení cév má za následek jednotlivé nebo mnohočetné mozkové infarkty, ischemické změny v bílé hmotě a drobná ložiska krvácení.

Prokazuje se, že rizikem pro mozkové krvácení při mozkové amyloidní angiopatii je nosičství alely ApoE2 bez ohledu na to, zda znaky pro Alzheimerovu chorobu přítomny jsou nebo ne. U pacientů s Alzheimerovou chorobou a těžkou amyloidní angiopatií se alela ApoE2 vyskytuje až 6x častěji, než u pacientů s Alzheimerovou chorobou a jen lehkou angiopatií.[13]

3.2.2.6 Ztráta neuronů

V průběhu klinicky normálního stárnutí klesá počet neuronů jen v některých oblastech mozku, a navíc v různém stupni. Přestože je to stále nejasné, Alzheimerova choroba pravděpodobně vychází také z nadměrné ztráty terminálních neuritů a dendritů, které vedou k atrofii neuronů v mozkové kůře, hipokampu a amygdale. Atrofie postihuje i cholinergní neurony. Numerická atrofie se zde projevuje již v raných fázích Alzheimerovy choroby. S hloubkou postižení kognitivních funkcí pozitivně koreluje jak numerická atrofie, tak koncentrace β amyloidu v hipokampu. Mechanismus zániku neuronů není zcela objasněn, mohou se na něm podílet změny v činnosti některých genů i oxidativní stres. [13][16]

3.2.2.7 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E je protein tvořený 299 aminokyselinami. Gen pro ApoE je polymorfní a nachází se ve třech alelách, které kódují tři různé izoformy ApoE2, ApoE3 a ApoE4. Lidé, kteří jsou homozygoti v alelách ApoE4, mají vyšší riziko vzniku onemocnění Alzheimerovou chorobou než heterozygoti nebo lidé, u kterých se tato izoforma nevyskytuje.[13]

3.2.2.8 Oxidativní stres

Oxidačním stresem se rozumí nerovnováha mezi oxidanty a antioxidanty ve prospěch oxidantů. V případě oxidačního stresu jsou produkovány volné radikály, které jsou schopny napadat makromolekuly a poškozovat funkce buněk a tkání. Poškození biologických struktur volnými radikály může vážně ohrozit fyziologické funkce a životaschopnost mimo jiné i nervových buněk. Zatím není možné říci, zda je oxidační stres primární příčinou rozvoje Alzheimerovy choroby nebo vzniká jako sekundární odezva patologických změn v mozku.[20]

3.2.3 Farmakoterapie

Protože doposud není etiologie Alzheimerovy choroby zcela objasněna, nelze tuto nemoc léčit kauzálně a současná farmakoterapie vychází ze znalosti pouze jednotlivých patologických mechanismů a jejich souvislostí. Dosavadní terapie tak neumožňuje úplné vyléčení, ale jen zpomalení progresu choroby. Pouze dva současné farmakoterapeutické přístupy jsou založeny na důkazech.

Terapie Alzheimerovy choroby má být komplexní a zahrnovat jak farmakoterapii, tak i psychosocioterapii. Psychoterapie zahrnuje i trénink paměti a nácvik orientace.[17][18][21]

3.2.3.1 Inhibitory cholinesteras

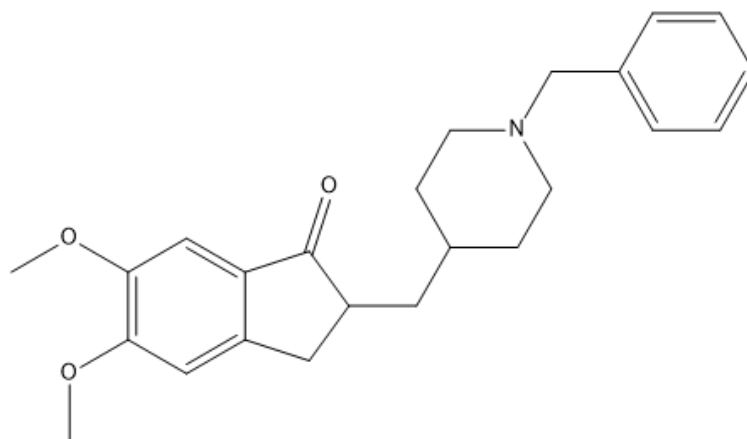
U Alzheimerovy choroby je nejvíce postižen mozkový acetylcholinergní systém. U jedinců postižených Alzheimerovou chorobou aktivita acetylcholinesterasy narůstá a způsobuje sníženou hladinu acetylcholinu v mozku. Enzym se také částečně podílí na tvorbě amyloidních plaků a neurofibrilárních spleť.[7] Proto se k léčbě Alzheimerovy choroby používají inhibitory acetylcholinestrasy a butyrylcholinesterasy, což má za následek zvýšení počtu molekul acetylcholinu a zlepšení acetylcholinergní transmise. Inhibitory mozkových cholinesteras představují v současné době hlavní terapeutický přístup k léčbě lehkých až středně těžkých stádií Alzheimerovy choroby. Obsahují terciární dusík a dobře procházejí hematoencefalickou bariérou.[22]

Inhibitory cholinesteras nejsou schopny Alzheimerovu chorobu zcela vyléčit, dokáží ale zpomalit průběh choroby a oddálit vznik těžkých stádií. Dochází ke zlepšení kognitivních funkcí, především paměti, nejčastějšími nežádoucími účinky jsou gastrointestinální příznaky, bolesti hlavy nebo křeče.[17][18]

Nejstarší látkou, která byla v USA a některých zemích Evropy uvedena na trh, je takrin. Měl ale vysoký výskyt potenciálně závažných nežádoucích účinků, jako hepatotoxicitu, a později přišly modernější látky jako donepezil a rivastigmin, díky nimž byla preskripce takrinu zastavena.[7]

3.2.3.1.1 Donepezil

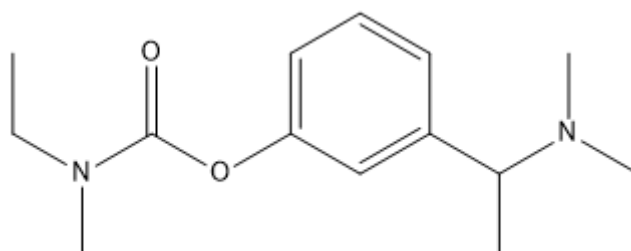
Donepezil je piperidinový derivát a specifický reverzibilní nekompetitivní inhibitor acetylcholinesterasy, převládající cholinesterasy v mozku. *In vitro* je více než tisíckrát účinnějším inhibitorem tohoto enzymu než butyrylcholinesterasy, enzymu vyskytující se hlavně mimo centrální nervový systém. [17][18] U pacientů s Alzheimerovou demencí, kteří se zúčastnili klinických studií, způsobilo podávání 5 mg nebo 10 mg donepezil-hydrochloridu jednou denně ustálenou inhibici aktivity acetylcholinesterasy o 63,6 % a 77,3 %. Maximálních plazmatických hladin je dosaženo přibližně za 3 – 4 hodiny po perorálním podání, biologický poločas je přibližně 70 hodin. Asi 95 % donepezil-hydrochloridu se u člověka váže na plazmatické bílkoviny. Donepezil-hydrochlorid je vylučován močí v nezměněném stavu. Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou průjem, svalové křeče, únava, nauzea, zvracení a nespavost. [23]



Obr. č. 3: Donepezil

3.2.3.1.2 Rivastigmin

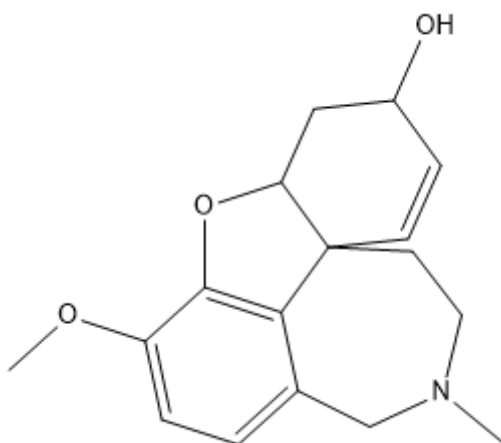
Rivastigmin je tzv. pseudoireverzibilní inhibitor karbamátového typu nejen mozkové acetylcholinesterasy, ale i butyrylcholinesterasy. Rivastigmin se kovalentně váže na svůj cílový enzym, se kterým tvoří komplex, čímž tento enzym dočasně inaktivuje. Během první 1,5 hodiny po podání perorální dávky 3 mg rivastigminu snižuje aktivitu acetylcholinesterasy v mozkomíšním moku přibližně o 40 %. Aktivita enzymu se navrácí k výchozí hodnotě přibližně za 9 hodin po dosažení maximálního inhibičního účinku. Rivastigmin je rychle a úplně absorbován. Maximálních plazmatických koncentrací dosahuje za 1 hodinu. Rivastigmin je poměrně rychle a rozsáhle metabolizován samotnými cholinesterasami, výsledný metabolit jen minimálně inhibuje acetylcholinesterasu. Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou nauzea a zvracení, a proto jsou kromě perorálních forem dostupné i transdermální náplasti. Rivastigmin se užívá především u formy Alzheimerovy choroby s psychotickými příznaky. [17][18][23]



Obr. č. 4: Rivastigmin

3.2.3.1.3 Galanthamin

Galanthamin je alkaloid z některých druhů narcisů a sněženek. Jedná se o reverzibilní inhibitor cholinesteras, zvláště významná je inhibice butyrylcholinesterasy, a zároveň alosterický modulátor na nikotinových receptorech, čímž se potencuje účinnost acetylcholinu. Galanthamin je velmi dobře tolerovaný a podává se buď v retardované, nebo neretardované formě.



Obr. č. 5: Galanthamin

Všechny tři látky vykazují podobné účinky a není důvod považovat některou z nich za nejvhodnější. Významnou výhodou donepezilu ve srovnání s galanthaminem a rivastigminem je jeho pohodlné užití pouze jednou denně. U některých pacientů preferujeme pomalejší titrace dávky u galanthaminu, jinde je jednodávkové schéma donepezilu nezbytné. Pokud se objeví některý z nežádoucích účinků, nejčastěji nevolnost a zvracení, neexistují vědecké důkazy o racionálnosti přechodu z jedné látky na druhou. Cytochrom P450 je do metabolismu rivastigminu zapojen méně, než u donepezilu a galanthaminu, opravdový význam v klinické praxi je ale minimální. [6]

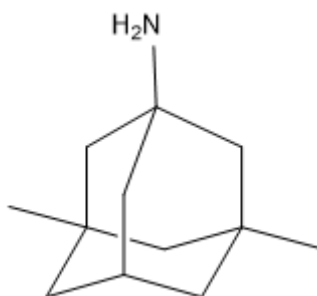
3.2.3.2 Inhibitory glutamátových receptorů NMDA

N-methyl-D-aspartátové receptory jsou spojeny s otvíráním iontových kanálů pro Ca²⁺ a Na⁺ ionty. Glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem v centrální nervové

soustavě a je zapojen do procesů nervového přenosu pro paměť a učení. V pokročilejších stádiích Alzheimerovy choroby dochází k nadměrnému uvolňování excitačních kyselin glutamátu a aspartátu – excitotoxicitě. To vede k nadměrnému vstupu Ca^{2+} do neuronu, následně aktivaci některých proteinkinás, expresi některých genů a v konečném důsledku apoptóze neuronů. Navíc nadměrnou nabídkou glutamátu je narušen proces dlouhodobé potenciace, čímž je narušeno učení a paměť. [17][18] Nicméně fyziologická aktivita glutamátu je nezbytná pro normální činnost mozku a nemůže být zcela přerušena. Nízkoafinitní antagonisté jako je memantin mohou tedy zabránit excitotoxicitě a přitom nenarušit fyziologickou funkci glutamátu.[6]

3.2.3.2.1 Memantin

Z inhibitorů NMDA receptorů se současně používá pouze jediná látka – memantin. Memantin je nekompetitivní antagonist na NMDA receptorech, upravuje účinky patologicky zvýšené excitačně působící hladiny glutamátu a je určen k léčbě středně závažných až závažných případů. Má absolutní biologickou dostupnost po perorálním podání. Kromě kognitivních funkcí pozitivně ovlivňuje i chování pacientů. Je velmi dobře snášen, u některých pacientů se ale mohou objevit halucinace nebo jiné psychotické symptomy. Výhodná je také jeho kombinace s inhibitory mozkových cholinesteras. [17][18]



Obr. č. 6: Memantin

3.2.3.3 *Ginkgo biloba*

Výtažek z listů *Ginkgo biloby* byl po staletí součástí tradiční čínské medicíny. Aktivní složky se sestávají z flavonoidů, terpenoidů a terpenových laktonů – ginkgolidy a bilobalidy, které jsou jedinečné pro léčbu Alzheimerovy choroby. Dobře definovaný extrakt EGb 761 je uveden na trhu jako Tanakan, Tebokan nebo Gingio. Extrakt je široce předepisován pro mozkovou nedostatečnost, což zahrnuje řadu případů včetně problémů s pamětí a koncentrací, zmatenost, depresi, úzkost a bolesti hlavy. Mimo jiné zvyšuje průtok krve dilatací arteriol a snižuje množství volných radikálů. Má minimum nežádoucích účinků, jsou ale hlášeny případy subdurálního hematomu při podání vyšších dávek a hyphema – krvácení do přední komůrky oka při kombinaci s kyselinou acetylsalicylovou. Dostupné studie zatím nedokázaly účinnost *Ginkgo biloby* proti demenci.[6]

3.2.3.4 Nootropika

Nootropika jsou chemicky nesourodou skupinou léčiv, která zlepšují mozkové funkce, zvyšují schopnost koncentrace a působí příznivě u stavů vyčerpanosti.[24] Zlepšují metabolické pochody v mozkové tkáni a umožňuje lepší využití živin a mediátorů. Tyto účinky se většinou projevují až po delší době užívání nootropik.

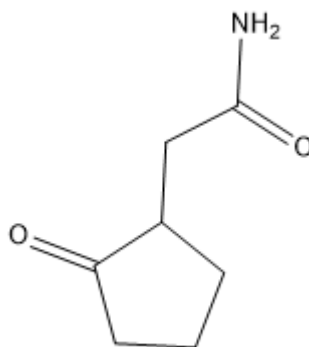
Příznivý vliv nootropik na mozkové funkce je založen na více mechanismech. Jejich přesný mechanismus ale stále nebyl komplexně objasněn. Zlepšují dostupnost a utilizaci glukosy v mozku, urychlují cerebrální metabolismus proteinů a nukleových kyselin a interagují s neurálními membránami, kde usnadňují metabolismus fosfolipidů. U některých byl prokázán i ochranný efekt před volnými radikály.

U Alzheimerovy choroby nebyl význam nootropik doposud jednoznačně potvrzen. U Alzheimerovy choroby dochází k snížení neuronálního metabolismu, především oxidativního metabolismu glukosy a buněčné proteosyntézy. Proto se používají látky označované jako nootropika, která zvyšují odolnost nervové tkáně k hypoxii, oxidativní metabolismus glukosy a neuronální proteosyntézu.[13][22]

Nootropika bývají velmi dobře tolerována, mají minimum vedlejších účinků a používají se pouze v kombinační terapii.

3.2.3.4.1 Piracetam

Piracetam je chemicky příbuzný s inhibitory neurotransmiteru GABA. Patří mezi nootropika, látky posilující kognitivní funkce bez známek sedace nebo psychostimulace. Piracetam je nejpoužívanějším nootropikem a je podáván k léčbě psychosyndromů nebo cerebrovaskulárních příhod. Výsledky mnoha studií potvrzují obrovský význam piracetamu u kognitivních poškození.[13][6]



Obr. č. 7: Piracetam

Dalšími nootropiky jsou například meklofenoxát, pyritinol, pramiracetam a oxiracetam.

3.2.3.5 Vitamin E

Vitamín E je souhrnný název pro v tučích rozpustné chemické látky odvozené od tokoferolu a tokotrienolu, které se vyskytují hlavně v rostlinných olejích a ořechách. Řadí se mezi antioxidanty, které neutralizují kyslíkové radikály a pomáhají při nemocích spojených se stářím. Studie, které zkoumají význam vitamínu E u Alzheimerovy choroby, stále probíhají.[6]

3.2.3.6 Estrogeny

U žen působí preventivně proti Alzheimerově nemoci podávání estrogenů. Zjistilo se, že u žen po menopauze, u kterých se neprováděla substituce estrogeny, je vyšší výskyt Alzheimerovy nemoci než u žen, kterým byly estrogeny podávány. Proto se i podávání estrogenů považuje za preventivní přístup.[13]

3.3 *Vinca minor L.*

TAXONOMIE [25]	
ŘÍŠE:	<i>Plantae</i>
PODŘÍŠE:	<i>Tracheobionta</i>
ODDĚLENÍ:	<i>Magnoliophyta</i>
TŘÍDA:	<i>Magnoliopsida</i>
PODTŘÍDA:	<i>Lamiidae</i>
ŘÁD:	<i>Gentianales</i>
ČELEĎ:	<i>Apocynaceae</i>
ROD:	<i>Vinca</i>
DRUH:	<i>Vinca minor L.</i>

Tabulka č. 1: Taxonomické zařazení *Vinca minor L.*

3.3.1 Čeleď *Apocynaceae*

☞ * K(5) [C(5-4) A5] G(2) [25]

Čeleď *Apocynaceae* se skládá z tropických stromů, keřů, polokeřů, vytrvalých bylin a popínavých rostlin. Čeleď nyní zahrnuje více než 150 rodů a 2000 druhů, které se vyskytují převážně v subtropích a tropech, jen pár z nich zasahuje do temperátního pásu. Společným znakem pro téměř všechny zástupce je přítomnost nečlánkovaných mléčnic, které produkují mléčnou šťávu. Listy jsou obvykle vstřícné nebo v přeslenech, téměř vždy bez palistů, jednoduché, celokrajné a stálezelené, plodem je tobolka, měchýřek, bobule nebo peckovice a cévní svazky jsou bikolaterální.[26] V tradiční medicíně jsou druhy čeledi *Apocynaceae* používány k léčbě gastrointestinálního traktu,

horečky, malárie, bolesti, diabetu, kožních a ektoparazitárních onemocnění, mnoho z nich se vysazují také jako okrasné rostliny. Bylo prokázáno, že druhy *Apocynaceae* mají protirakovinné a antimalarické účinky. Farmaceuticky významné obsahové látky čeledi jsou kardioaktivní glykosidy, indolové alkaloidy, sekoiridoidní a iridoidní monoterpeny a také polyterpeny rozptýlené v latexu. Významnými rody patřící do této čeledi jsou *Catharanthus L.*, *Rauvolfia L.*, *Strophanthus* nebo *Tabernanthe*. [25][27]

3.3.2 Rod *Vinca*

Rod *Vinca L.* je původní v Evropě, severní Africe a jihozápadní Asii a zahrnuje 6 druhů.[28]

Vinca difformis



Obr. č. 8: *Vinca difformis* květ, *Vinca difformis* porost [29]

Vinca herbacea



Obr. č. 9: *Vinca herbacea* [30]

Vinca erecta



Obr. č. 10: *Vinca erecta* [31]

Vinca major L.



Obr. č. 11: *Vinca major* L. květ, *Vinca major* L. porost [32]

Vinca minor L.



Obr. č. 12: *Vinca minor L.* květ, *Vinca minor L.* porost [33]

3.3.3 *Vinca minor L.*

3.3.3.1 Popis

Vinca minor L. je malá vytrvalá bylina patřící do čeledi *Apocynaceae*, která se rozrůstá svým dlouze plazivým oddenkem a tvoří souvislé porosty. Lodyha je poléhavá, dlouhá až 80 cm, na bázi dřevnatějící a u květu vystoupavá. Listy mají typickou tmavě zelenou brčálovou barvu, na rubu světlejší, jsou krátce řapíkaté, vstříčné, neopadavé a kožovité, krátce kopinaté až eliptické. Květy jsou fialově modré charakteristicky stočené, oboupohlavné a pětičetné, plodem jsou měchýřky. Rostlina je myrmekochorní, šíření semen zajišťují mravenci, rozmnožuje se ale především vegetativně oddenky.

Českým názvem Barvínek menší neboli Brčál je jediný volně rostoucí zástupce čeledi u nás, často jako důsledek zplanění. Protože byl hojně pěstován, můžeme ho najít v okolí lidských sídlišť, hřbitovů, zřícenin a hradů. Kveté od března do června a s největší pravděpodobností ho můžeme najít v lesích, především listnatých. Původně evropský druh je dnes rozšířen i na jiných kontinentech, v Severní Americe se dokonce jedná o vysoce invazivní druh.[34] Najdeme ho především v mírném pásu, dává přednost teplotám v rozmezí mezi 15 – 25 °C.[5] Vytváří kompaktní porosty na čerstvých, vlhkých, živinami bohatých půdách.[25][28][35]

Barvínek byl po dlouhá staletí pěstován jako okrasná, rituální a léčivá bylina. Pro své stále zelené listy byl považován za symbol věčného života a hojně vysazován na hroby. V našem prostředí je rostlina považována za jedovatou.[34]

3.3.3.2 Obsahové látky

Kvetoucí nať se sbírá od června do července seřezáváním. Hlavními účinnými složkami drogy jsou indolové alkaloidy, jejichž průměrné množství v droze se pohybuje kolem 0,3 – 1 %. Vedlejší látky jsou především flavonoidní glykosidy a třísloviny. Dále jsou přítomny saponiny, pektin a amorfni hořčina vincin. Z alkaloidů je nejvýznamnější vinkamin, vinkamidin, isovinkamin, vinkaminorein a vinkaleukoblastin.[36][37]

Doposud bylo z barvíčku izolováno více než 50 alkaloidů indolového typu. Alkaloidy se akumulují především v listech rostliny. Kvalitu rostlinného materiálu a tedy i koncentraci jednotlivých alkaloidů ovlivňuje kvalita půdy, klima a řada dalších aspektů.[38]

3.3.3.2.1 Indolové alkaloidy

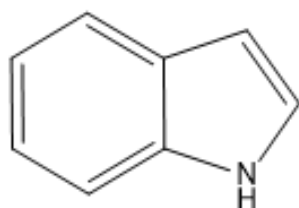
Alkaloidy jsou různorodá skupina nízkomolekulárních sloučenin, které obsahují dusík a vycházejí především z aminokyselin. Jako sekundární metabolity rostlin, alkaloidy pravděpodobně hrají důležitou úlohu v obraně před býložravci a patogeny. Vzhledem k jejich různě významným biologickým účinkům je lze využít i jako léčiva, stimulanty, narkotické látky nebo jedy.[39]

Indolové alkaloidy vycházejí z aminokyseliny L-tryptofanu, neutrální heterocyklické aminokyseliny, která obsahuje strukturu indolového systému a odbourává se na tryptamin dekarboxylací L-tryptofanu. Na jejich biosyntéze se mohou také podílet terpenické jednotky. Indolové alkaloidy jsou rozděleny do několika kategorií a jedná se o vůbec nejpočetnější skupinu alkaloidů. Jsou to jednoduché indolové alkaloidy, β -karbolinové alkaloidy a terpenické alkaloidy. Mezi indolové alkaloidy se řadí i alkaloidy rodu *Vinca spp.*, i když mohou mít trochu odlišnější strukturu.[37]

Jednoduché indolové alkaloidy jsou deriváty tryptaminu, tedy prekurzorem je pouze L-tryptofan. Poté dochází k jeho methylaci a dává vzniknout např. psilocinu nebo psilocybinu.

U β -karbolinových alkaloidů dochází k vytvoření nového šestičlenného heterocyklického kruhu vlivem Mannichovy reakce primárního aminu s aldehydovou skupinou. Mezi takové alkaloidy můžeme zařadit harman nebo harmalin.

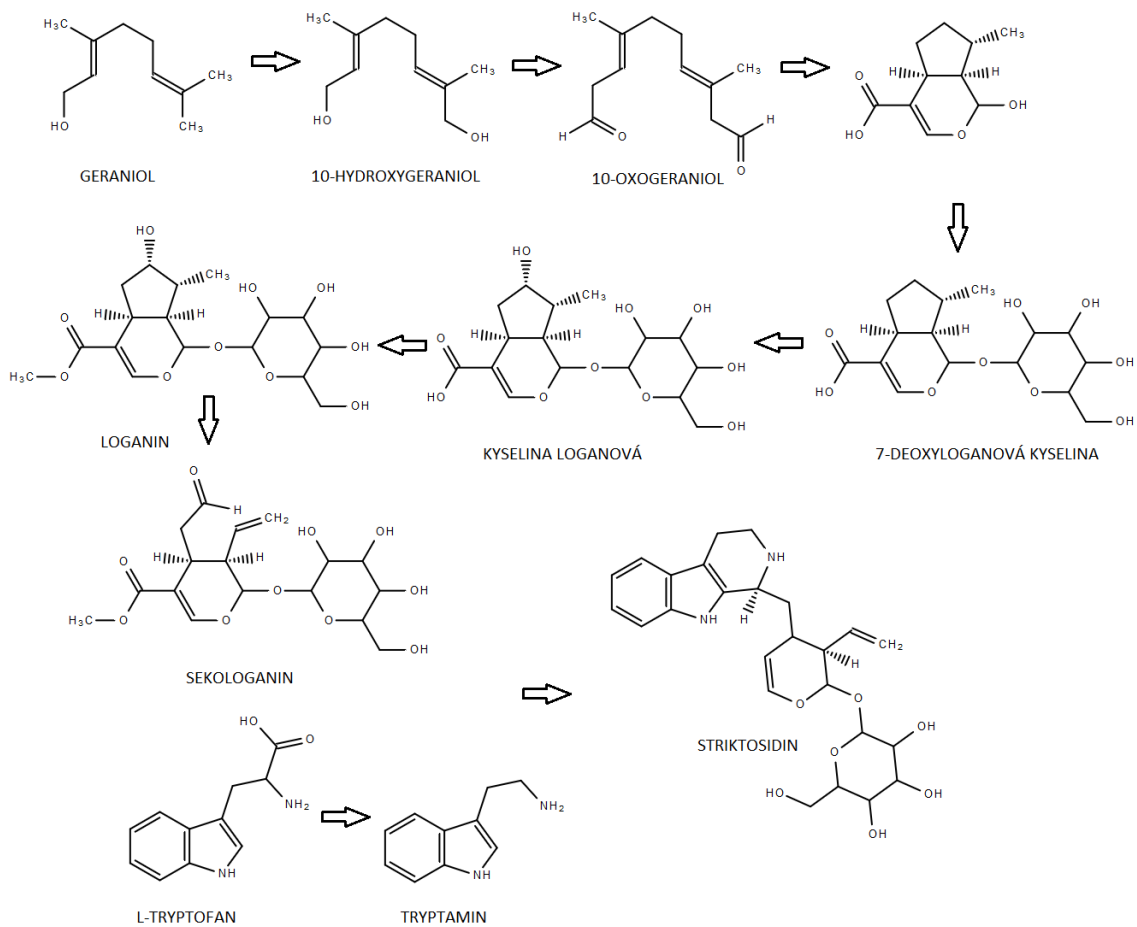
Další skupinou indolových alkaloidů jsou terpenické indolové alkaloidy.[40]



Obr. č. 13: Indol

3.3.3.2 Terpenické indolové alkaloidy

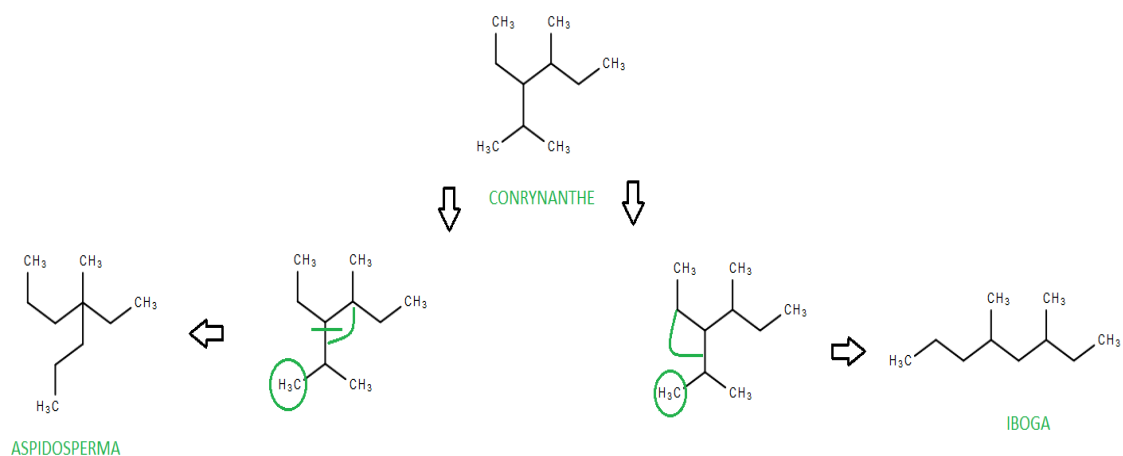
Monoterpenické indolové alkaloidy představují možná hlavní skupinu alkaloidů, které zahrnují přes 3000 doposud objevených substancí vyskytující se pouze v 8 čeledích, z nichž nejznámější je právě čeleď *Apocynaceae*, *Loganiaceae* a *Rubiaceae*. [40] Hlavními zdroji těchto alkaloidů jsou *Catharanthus roseus* L. a *Rauvolfia serpentina*. Zahrnují strukturně i farmaceuticky různorodé látky, které však mají společný původ, jelikož jejich společným prekurzorem je glukoalkaloid striktosidin. [41] Striktosidin je produktem Pictet-Spenglerovy kondenzace indolové složky odvozené od tryptaminu a monoterpenické složky z iridoidního glykosidu sekologaninu. Striktosidin může podstoupit mnoho biochemických přeměn, které jsou zprostředkované cyklasami, reduktasami, hydroxylasami a mnoha dalšími, a může tak vytvořit několik tisíc různých sloučenin. [42] Striktosidin je dále přes několik nestabilních meziproductů přeměněn na dehydrogeissoschizin, představující klíčový meziproduct, ze kterého vznikají několika různými cestami indolové alkaloidy. [39]



Obr. č. 14 Biosyntéza terpenických indolových alkaloidů [40]

Ve všech strukturách indolových alkaloidů je zachována základní struktura tryptofanu a 9 - uhlíkatý nebo 10 - uhlíkatý fragment, odvozený od sekologaninu. Dle uspořádání 9C nebo 10C kostry rozdělujeme monoterpenické indolové alkaloidy do tří základních strukturních typů, corynanthe, aspidosperma a iboga.

Sekologanin je tvořen z geraniolu přes loganin, který obsahuje 10C strukturu, která dává základ charakteristický pro corynanthe. Přes následné přesmyky 10C části vzniká aspidosperma a iboga. Tyto přesmyky jsou charakterizovány odštěpením 3C fragmentu a následným připojením do jiné polohy, jako je to popsáno na obrázku č. 15.[40]



Obr. č. 15: Strukturní typy monoterpenických indolových alkaloidů

3.3.3.2.1 *Vinca minor* alkaloidy

Z rostliny *Vinca minor* L. byly izolovány tyto alkaloidy:[43]

(+)-1,2-dehydroaspidospermidin	reserpin
11, 12-dimethoxyeburnamonin	vincetin
eburnamenin	vincinin = vinkarein
(-)-eburnamin	vincin
(±)-eburnamonin	(-)-vinkadiformin
14-epivinkamin	(±)-vinkadiformin
20-hydroxyvinkamin	vinkadin
(+)-isoeburnamin	vinkamidin
isovinkamin	vinkamin = minorin
11-methoxyeburnamonin	vinkaminin
16-methoxyminovincin	vinkaminorein

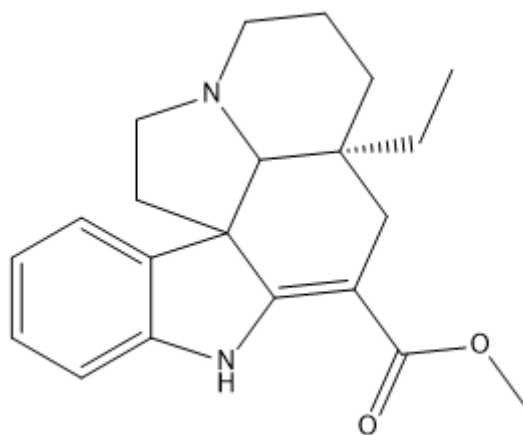
(+)-N-methylspidospermidin	vinkaminoridin
(±)-N-methylquebrachamin	vinkaminorin
(+)-minovincin	vinkarubin
minovincin	vinkatin
minovincinin	vinkoridin
perivincin	vinkorin
(+)-quebrachamin	vinoxin

Tabulka č. 2: Vybrané alkaloidy *Vinca minor* L.

Vinca alkaloidy jsou deriváty indolinu, indolu, hydroxyindolu a 3H-indolu a dle jejich struktury je můžeme rozdělit do následujících skupin:[44]

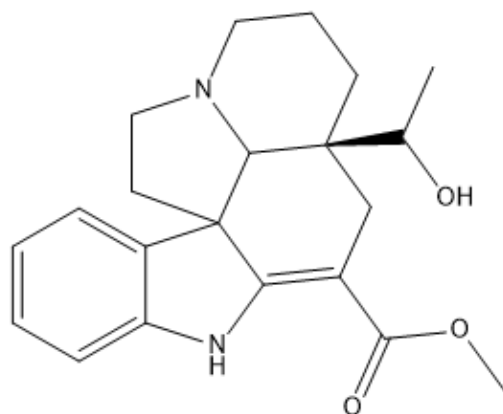
I. INDOLINOVÉ DERIVÁTY

(-)-vinkadiformin



Obr. č. 16: (-)-vinkadiformin

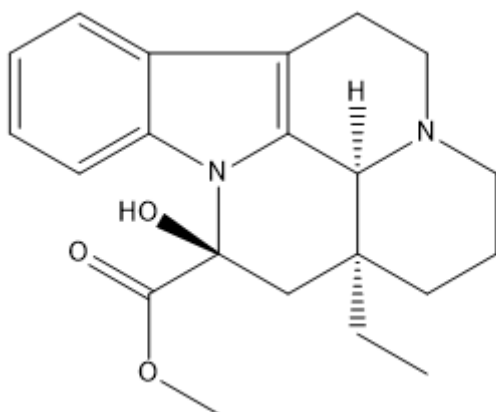
minovincinin



Obr. č. 17: minovincinin

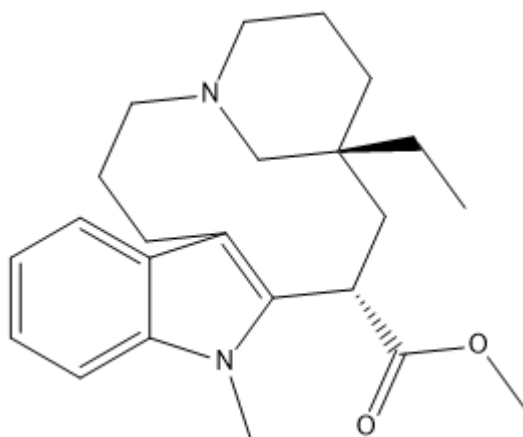
II. INDOLOVÉ DERIVÁTY

vinkamin



Obr. č. 18: vinkamin

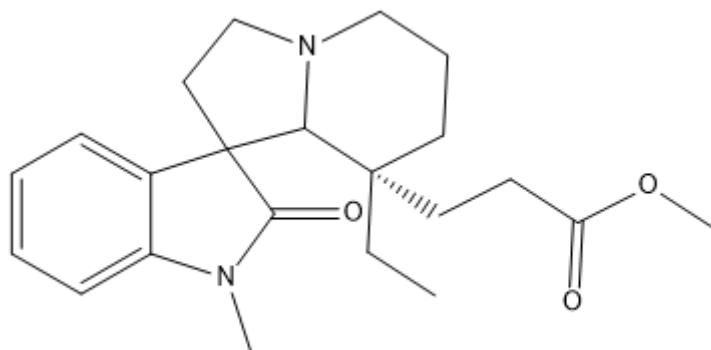
vinkaminorein



Obr. č. 19: vinkaminorein

II. OXINDOLOVÉ DERIVÁTY

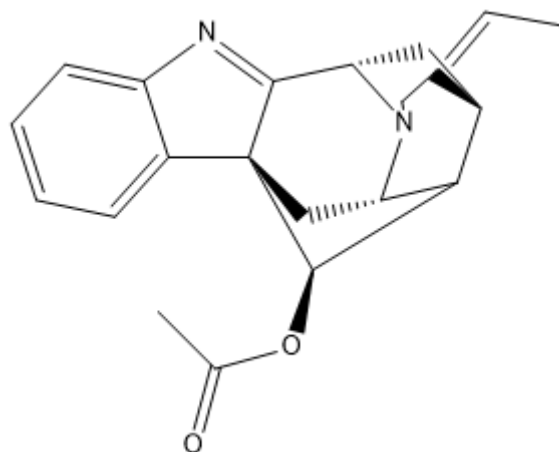
Vinkatin



Obr. č. 20: vinkatin

III. 3H-INDOLOVÉ ALKALOIDY

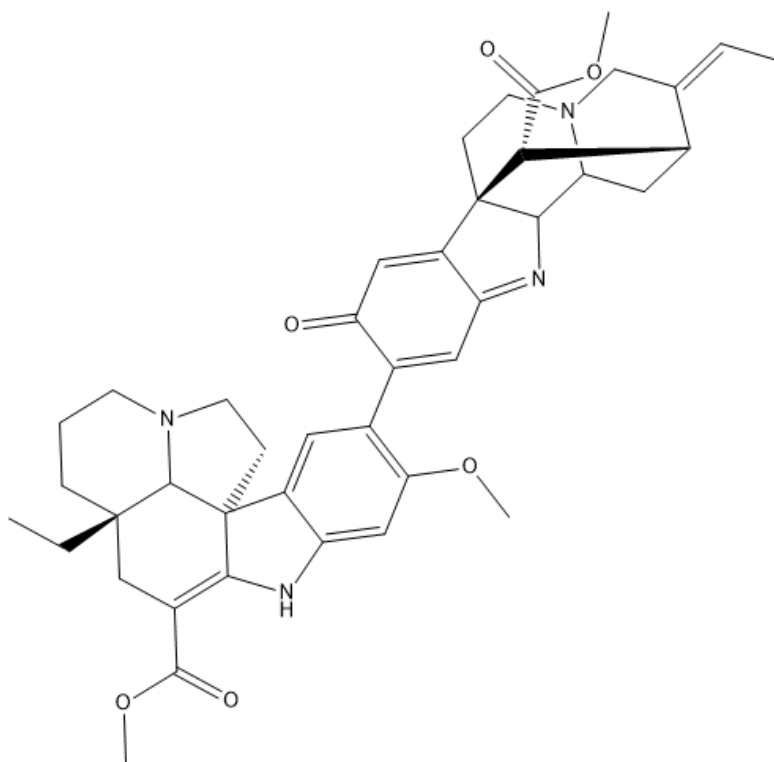
vinorin



Obr. č. 21: vinorin

IV. BISINDOLOVÉ ALKALOIDY

vinkarubin



Obr. č. 22: vinkarubin

Nejvíce zastoupeným alkaloidem v listech *Vinca minor L.* je v první řadě alkaloid vinkamin, dále vinkaminorein a 1,2-dehydroaspidospermidin. V kořenech zase 1,2-dehydroaspidospermidin.[45] Obsažené alkaloidy dosáhnou maximální koncentrace v období květu. Jediným alkaloidem mající bisindolovou strukturu, a který je přítomen ve *Vinca minor L.*, je vinkarubin. Některé alkaloidy mají i kvarterní strukturu, jako 4-methylaucubaininium chlorid, 4-methylstrictaminium chlorid a 4-methylakuammicinium chlorid. Ostatní alkaloidy jsou monomerní eburnaminového typu.[38]

3.3.3.3 Biologická aktivita obsahových látek

Nejrozsáhleji studovaným alkaloidem *Vinca minor L.* je vinkamin a především jeho semisyntetický derivát vinpocetin. Vinpocetin může procházet hematoencefalickou bariérou a vstoupit do mozku po perorálním nebo intravenózním podání.

Vinpocetin má tři základní molekulární cíle – fosfodiesterasa 1 (PDE1), napěťově řízené sodíkové kanály a I κ B kinasa (IKK). Bylo prokázáno, že PDE1 reguluje vasokonstrikci, vaskulární a srdeční remodelaci a neurotransmisi, sodíkové kanály hrají roli v buněčné smrti a IKK v zánětlivém procesu.

Řada studií ohlásila ochranný účinek vinpocetinu na mozek po jeho ischemickém poškození. Vinpocetin působí jako cerebrální vasodilatátor a zlepšuje cerebrální metabolismus zvýšením příjmu kyslíku a glukosy a produkce ATP. Vinpocetin tak prostřednictvím různých molekulárních cílů působí vysoce neuroprotektivně a jeho účinky nejsou omezeny pouze na mozek, ale pomáhá i na jiných místech postižených ischemií, jako v oblasti sítnice nebo ledvin. Účinky na periférii jsou pravděpodobně způsobené inhibicí PDE1. Vedle vasodilatace také zpomaluje spontánní remodelaci cév. Vinpocetin tak představuje slibné léčivo pro terapii vaskulární aterosklerózy a kalcifikace.[46][47]

Vinpocetin má prokázané protizánětlivé účinky v řadě kultivovaných buňkách in vitro jako endoteliální buňky, buňky hladkého svalstva, monocyty/makrofágy, neutrofilie a dendritické buňky. Přímo inhibuje IKK, což má za následek supresi zánětlivých molekul a vlastní protizánětlivý účinek.

Vinpocetin také výrazně oslabuje proces fibrotizace a remodelace srdeční tkáně. Potlačuje aktivitu fibroblastů a růst myocytů.[48]

Vinkarubin je jediný alkaloid s bisindolovou strukturou zaznamenaný u této rostliny, u kterého byla prokázána jeho cytotoxická aktivita proti P388 leukemickým buňkám.[38]

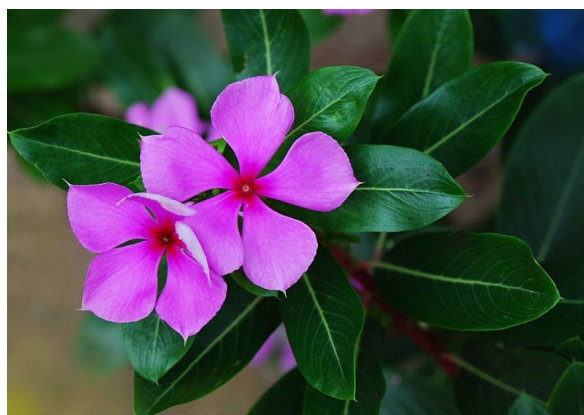
3.3.3.4 Použití v terapii

V dřívějších dobách patřila *Vinca minor L.* mezi velmi využívané rostliny. Používala se k léčbě bolesti zubů, hadího uštknutí, vysokého krevního tlaku, dále i jako karminativum, hemostatikum a pro její adstringentní účinky.[43] Dobře působí i při zánětech sliznice dutiny ústní a onemocnění dolních cest dýchacích.[36]

Hlavním alkaloidem listů barvínku je určitě vinkamin, který moduluje krevní cirkulaci v mozku a neuronální homeostázu, zabraňuje hypoxii a má neuroprotektivní účinky. Vinkamin a především jeho semisyntetické deriváty se užívají jako nootropika k léčbě cerebrovaskulární nedostatečnosti a jiných poruch u starších pacientů, jako problémy s pamětí nebo bolesti hlavy.[38] Vincocetin se v mnoha zemích používá pro prevenci a léčbu mrtvice, senilní demence a poruchy paměti. Protože nejsou známé závažné vedlejší účinky, je obsažen v mnoha doplňcích stravy.[46]

3.3.4 *Catharanthus roseus L.*

Dalším důležitým zdrojem vinca alkaloidů je *Catharanthus roseus L.* Jde o tropický polokeř s protistojnými, kopinatými, lesklými a tmavozelenými listy dorůstající do výšky 30 až 60 cm, čímž se liší od přízemní *Vinca minor L.* Květy jsou načervenalé, růžové, nebo bělavé s průměrem až 4 cm. Pochází z Madagaskaru, odkud se rozšířil do dalších tropických a subtropických oblastí. Drogu neposkytuje, používá se výhradně pro izolaci alkaloidů.[49]

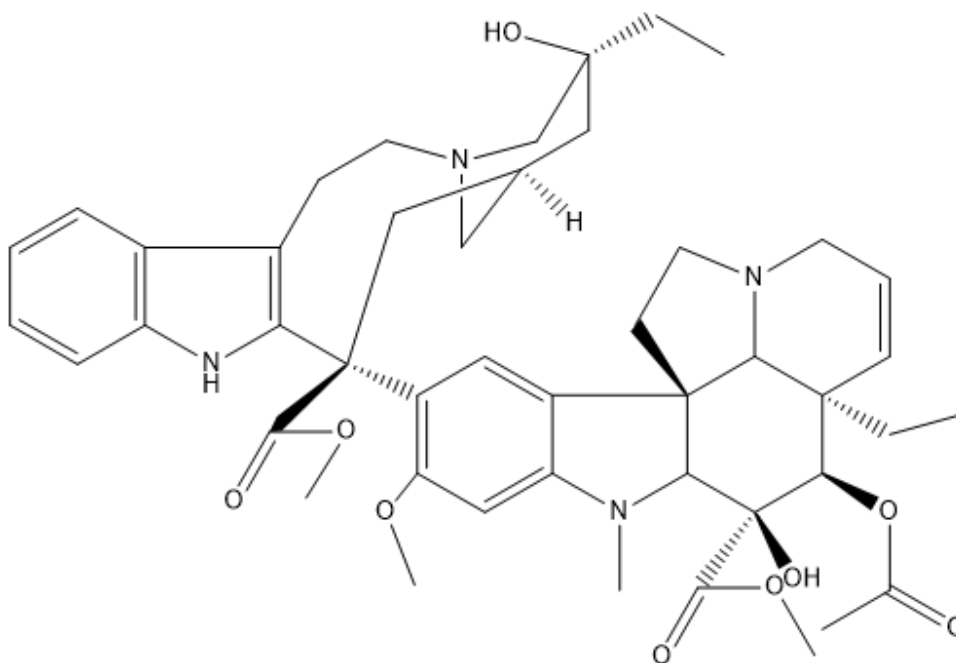


Obr. č. 23: *Catharanthus roseus L.*[50]

Největší obsah alkaloidů mají listy, naproti tomu semena je neobsahují vůbec. Nadzemní část rostliny obsahuje 0,2 – 1 % alkaloidů. Nejvýznamnějšími alkaloidy produkované touto rostlinou jsou dimerní vinca alkaloidy vinblastin a vinkristin, které hrají nezastupitelnou roli v léčbě rakoviny.[51] Vinblastin se skládá z alkaloidů katharanthinu a vindolinu a vinkristin má velmi obdobnou strukturu, jako vinblastin.[37] Řadí se mezi mitotické jedy, které jsou schopny narušit syntézu mitotického vřeténka. Celkově se izolovalo okolo 100 alkaloidů z této rostliny, například ajmalicin, lochnerin, vindolin, nebo katharanthin.

Významné jsou také semisyntetické deriváty, které si své místo našly také jako protirakovinná léčiva. Zatímco přírodní alkaloid vinblastin byl aplikovaný v léčbě Hodgkinovy choroby a rakoviny prsu, vinkristin v léčbě akutní leukemie. Semisyntetické vinca alkaloidy vinorelbin, vindezín a vinflunin jsou využívány i v dalších indikacích.[52]

Rostlina se v dřívějších dobách tradičně používala jako antidiabetikum, tento účinek však nebyl experimentálně potvrzen. Při přezkoumávání tohoto účinku byl objeven právě antimitotický účinek.



Obr. č. 24: vinblastin

4 Experimentální část

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Příprava rozpouštědel

Veškerá rozpouštědla, která byla při práci použita, byla nejprve přečištěna frakční destilací komerčních rozpouštědel a následně umístěna do skleněných tmavých stojatek pro ochranu před světlem.

4.1.2 Příprava litých desek

Základní metoda byla tenkovrstvá chromatografie. Skleněné desky o rozměru 150 x 150 mm byly nejprve řádně umyty vodou a odmaštěny ethanolem. Následně se připravená suspenze obsahující 6,5g silikagelu a 21 ml destilované vody vylila na připravenou desku a rovnoměrně rozprostřela do celé plochy. Na 1 cm² desky tedy připadá 0,03 g silikagelu v 0,1 ml destilované vody. Desky musí schnout minimálně po dobu 24 hodin.

4.1.3 Odpařování extraktů

Odpaření extraktů se provádělo na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě maximálně 40 °C. Následně byly kvantitativně převedeny do vialky a odpařeny pomocí vodní lázně o teplotě 60 °C a proudu vzduchu. Závěrečné dosušení téměř vysušeného extraktu probíhalo v exsikátoru nad silikagelem.

4.1.4 Detekce alkaloidů

Pro detekci alkaloidů byla použita UV lampa při vlnových délkách 254 a 366 nm. Popřípadě se povrch pokryl Dragendorffovým činidlem, což je jodobismutitan draselný K[Bil₄]. Přítomnost alkaloidů se projeví oranžovým až oranžovočerveným zbarvením.

Tato reakce slouží k obecnému důkazu alkaloidů obsahující terciární a kvarterní dusík v molekule.

4.1.5 Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla provedena standardním způsobem. Sloupec se předpřipravil nalitím suspenze obsahující silikagel v mobilní fázi do kolony.

4.1.6 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie byla provedena pomocí skleněných destiček s tenkou vrstvou silikagelu v chromatografických komorách. Komory byly nejprve nasyceny parami vhodné mobilní fáze.

4.2 Potřeby a chemikálie pro izolaci alkaloidů

4.2.1 Rozpouštědla

ethanol 95% denaturovaný methanolem (Lihovar Kolín) (EtOH)

chloroform p. a. (Penta) (CHCl₃)

methanol LC-MS CHROMASOLV® (Sigma-Aldrich) (MeOH)

lékařský benzín lékopisné kvality ČL 2009 (Penta) (Bz)

n-hexan p. a. (Penta) (n-Hx)

ethylacetát p. a. (Penta) (EtOAc)

diethylamin p. a. (LachNer) (Et₂NH)

cyklohexan (cykloHx)

aceton (Penta)

4.2.2 Chemikálie

amoniak 25% vodný roztok p. a. (Lachema)

kyselina chlorovodíková 2% p. a. (Lachema)

hydroxid sodný 2% č. (Lachema)

síran sodný bezvodý č. (Penta)

4.2.3 Detekční činidla

Dragendorffovo činidlo

Roztok A: 1,7 g bazického dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné se rozpustí v 80 ml vody.

Roztok B: 16 g jodidu draselného se rozpustí ve 40 ml vody.

Dragendorffovo činidlo bylo připraveno smísením roztoku A a roztoku B v poměru 1:1. 5 ml toho roztoku se následně přidalo k roztoku 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody a teprve tento roztok byl připraven pro detekci alkaloidů.

4.2.4 Chromatografické adsorbenty

Skleněné lité desky Kieselgel G UV 254 nm (Merck)

Oxid hlinitý neutrální 100 μm deaktivovaný 6% vody (Sigma-Aldrich)

Komerční desky Merck Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck)

4.2.5 Vytvájecí soustavy pro TLC izolaci alkaloidů

S 1: EtOAc-n-Hx-Et₂NH (n-hexan, ethylacetát, diethylamin) 60:30:1

S 2: cyklo-Hx-aceton-NH₃ (cyklohexan, aceton, amoniak) 50:5:1

S 3: To-EtOAc-Et₂NH (toluen, ethylacetát, diethylamin) 8:2:1

4.2.6 Přístroje

Vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114

4.3 Velká extrakce *Vinca minor* L.

Velká extrakce *Vinca minor* L. byla provedena nad rámec mé diplomové práce.

4.3.1 Příprava základního extraktu a chloroformového výtřepku

Materiál pro extrakci byl dodán komerčně. (Megafyt, Vrané nad Vltavou, 2013, jemně řezaná droga).

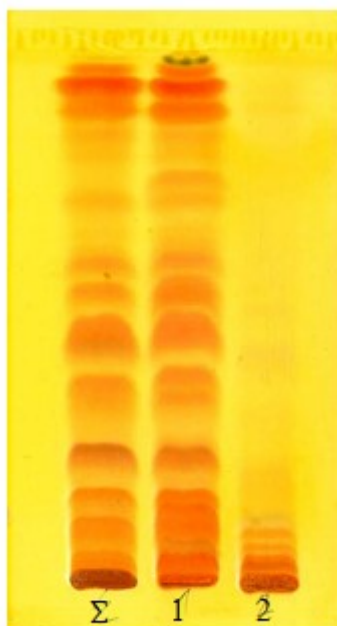
Po částech bylo extrahováno celkem 62 kg nati. K 500 g nati se přidaly 3 litry 95% ethanolu, směs se přivedla k varu a vařit se nechala po dobu 30 minut. Po filtraci se postup zopakoval ještě jednou. Spojené ethanolové extrakty se zahustily oddestilováním ethanolu a do zbytku se za horka přidala horká voda až do objemu 70 litrů. Vyloučený chlorofyl a kyselina ursolová, prezentované jako šedavě zelená sedlina, se odfiltrovala na Büchnerově nálevce přes filtrační papír. Hnědý filtrát se následně zalkalizovat 25% amoniakem až na pH 9 – 9,5 a vzniklá sedlina alkaloidů se vytřepala 5 × 15 litry chloroformu. Chloroformový výtřepku by odpařen do sucha, kdy se získalo 454 g tmavě hnědého a velice viskózního odparku.

4.3.2 Příprava předčištěného chloroformového výtřepku

Pro předčištění chloroformového výtřepku bylo použito na 1 g extraktu 10 g oxidu hlinitého se stupněm aktivity III a o velikosti zrn 100 – 250 µg jako stacionární fáze. Na rozpuštění 1 g extraktu bylo potřeba 20 ml chloroformu. Po filtraci přes sloupec oxidu hlinitého byl sloupec promyt potřebným množstvím chloroformu a následně směsí CHCl₃-EtOH v poměru 9:1. Filtráty byly následně odpařeny a celkem se získalo 201 g CHCl₃ tmavě hnědého, velmi viskózního odparku a 94 g CHCl₃ + 10% EtOH hnědého pěnovitého odparku.

	Výtřepok 1	Výtřepok 2	Výtřepok 3	Výtřepok 4
Hmotnost	95 g	132 g	115 g	111 g
Množství Al ₂ O ₃	950 g	1320 g	1150 g	1110 g
Rozměry sloupce	75 x 190 mm	75 x 250 mm	75 x 210 mm	75 x 230 mm
CHCl ₃ na rozpuštění výtř.	1900 ml	2640 ml	2300 ml	2220 ml
Promytí sloupce CHCl ₃	1900 ml	2640 ml	2300 ml	2220 ml
Odparek CHCl ₃	49 g	50 g	58 g	44 g
Promytí sl. CHCl ₃ + 10 % EtOH	1900 ml	2640 ml	2300 ml	2220 ml
Odparek CHCl ₃ + 10 % EtOH	18 g	26 g	19g	31 g
Celkem CHCl ₃ odparku	201 g tmavě hnědý, velmi viskózní			
Celkem CHCl ₃ +10 % EtOH odp.	94 g hnědý, pěnovitý			

Tabulka č. 3: Příprava předčištěného CHCl₃ výtřepku



Obr. č. 25: Chromatogram předčištěného výtřepku

Kieselgel G UV 254 Merck, dráha 8,5 cm, EtOAc + MeOH 9 : 1, komora nasycená, vyvíjení 1x, detekce Dragendorffovým činidlem

Σ - původní, surový chloroformový výtřepok alkaloidů z nati

1 – čištění na oxidu hlinitém – eluce sloupce CHCl_3

2 – čištění na oxidu hlinitém – eluce sloupce $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH } 9 : 1$

4.3.3 Chromatografie předčištěného chloroformového výtřepku

Metodou dělení extraktu na jednotlivé frakce byla sloupcová chromatografie. Sloupec byl tvořen skleněnou trubicí neboli kolonou, jako stacionární fáze se zvolil oxid hlinitý a jako mobilní fáze různé směsi benzenu, chloroformu a ethanolu. Principem chromatografie bylo rozdělení extraktu na jednotlivé frakce pomocí stupňovité eluce rozpouštědly Bz + CHCl_3 , $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ a EtOH. Obsah frakcí se průběžně kontroloval pomocí tenkovrstvé chromatografie a frakce obsahující stejné alkaloidy se spojily. Celkově se získalo 531 frakcí o souhrnné hmotností 142,27 g. Těchto 531 frakcí se spojilo do výsledných 19 frakcí, z nichž 2 byly vyloučeny pro nulový obsah alkaloidů. Po rozdělení extraktu se následně z jednotlivých frakcí získávaly samotné alkaloidy.

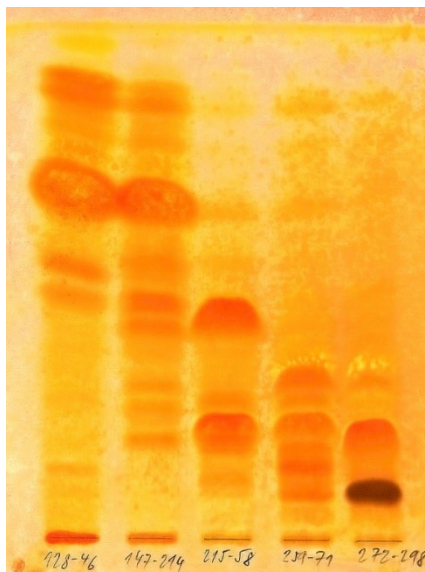
Podmínky sloupcové chromatografie jsou shrnuty v tabulce č. 4.

Množství odparku	200,0 g
CHCl_3 na rozpuštění odparku	300 ml
Adsorbent na roztěr	500 g
Adsorbent	Aluminium oxide neutral, ~150 mesh (100 μm) Aldrich No. 199974-5 kg deaktivovaný 6 % vody; 6,0 kg
Dělicí vrstva ve sloupci	Ø 15 x 35 cm
Vrstva s extraktem	Ø 15 x 2,9 cm
Mrtvý objem	4,4 litru
Frakce	500 ml
Doba toku 1 frakce	ca 25 min

Tabulka č. 4: Sloupcová chromatografie CHCl_3 výtřepku

Spojené frakce	Frakce	Eluce	TA (g)	Odparek (g)	Popis
1-27	1-16	Bz + CHCl ₃ = 95 + 5	0	0	Vyloučeno, bez alkaloidů
	17-26	Bz + CHCl ₃ = 90 + 10			
27-48	27-48	Bz + CHCl ₃ = 90 + 10	10,1091	0,82	Žlutý, voskovitý
49-72	49-66	Bz + CHCl ₃ = 90 + 10	0	0	Vyloučeno, bez alkaloidů
	67-72	Bz + CHCl ₃ = 87,5 + 12,5			
73-110	73-90	Bz + CHCl ₃ = 87,5 + 12,5	9,4032	1,44	hnědočervený, velmi viskózní
	91-98	Bz + CHCl ₃ = 85 + 15			
	99-105	Bz + CHCl ₃ = 85 + 15			
	106-110	Bz + CHCl ₃ = 80 + 20			
111-120	111-120	Bz + CHCl ₃ = 80 + 20	9,5045	0,26	Žlutohnědý, velmi viskózní
121-127	121-127	Bz + CHCl ₃ = 75 + 25	9,3649	0,28	Žlutohnědý, velmi viskózní
128-146	128-146	Bz + CHCl ₃ = 75 + 25	63,7974	10,81	Řídký, sv. hnědý
147-214	147-154	Bz + CHCl ₃ = 75 + 25	71,6769	27,03	Hnědý, velmi viskózní
	155-180	Bz + CHCl ₃ = 70 + 30			
	181-194	Bz + CHCl ₃ = 70 + 30			
	195-214	Bz + CHCl ₃ = 65 + 35			

Tabulka č. 5: Vybrané spojené frakce sloupcové chromatografie, červeně označena frakce, která byla v diplomové práci dále zpracovávána



Obr. č. 26: Vybraná frakce 128 – 146, Kieselgel G UV 254 Merck, dráha 8,5 cm, nHx + EtOAc + Et₂NH = 30 : 11 : 1, komora nasycená, vyvíjení 2x, detekce Dragendorffovo č.

4.4 Izolace jednotlivých alkaloidů

Frakce č. 5, která vážila 10,81 g, byla dále dělena Flash chromatografií na silikagelu za gradientové eluce. Jako mobilní fáze se použila směs CHCl₃ a EtOH, podíl ethanolu byl od 0 do 100 % a průtoková rychlost 60 ml/min. Získalo se 1,32 g frakce č. 128-156/48-53, která se dále dělila na skleněných deskách s tenkou vrstvou silikagelu. Jako mobilní fáze se použila směs To-EtOAc-Et₂NH (8:2:1) a získaly se 3 podfrakce.

Pro naší diplomovou práci byla dále zpracovávána frakce č. 5 128-146/48-53/(3), která vážila 320 mg.

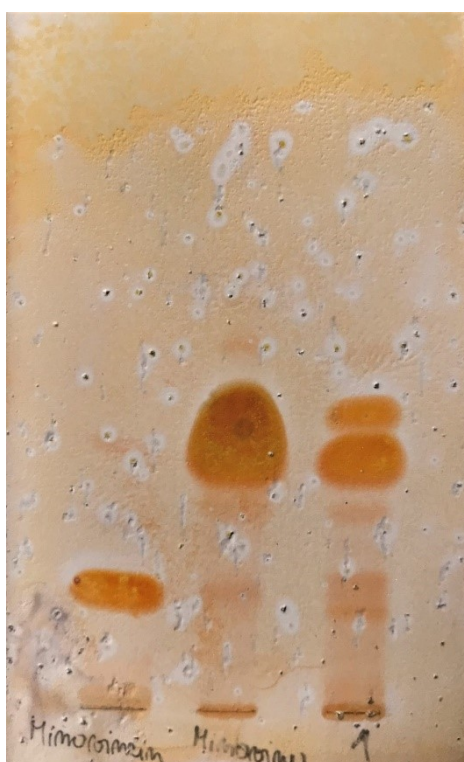
K separaci jednotlivých alkaloidů byla použita preparativní tenkovrstvá chromatografie. Frakce byla nejprve nanášena na 20 skleněných desek pokrytých tenkou vrstvou oxidu křemičitého a vyvinuta v komorách nasycených mobilní fází. Jako mobilní fáze byla použita následující: EtOAc-n-Hx-Et₂NH (60:30:1). Získali jsme 3 podfrakce LM-5.1, LM-5.2 a LM-5.3.

Po krystalizaci ze směsi EtOH a CHCl₃ (1:1) bylo získáno 54 mg čisté bílé krystalické látky LM-5.2, která byla následně identifikována a podrobena zkouškám biologické aktivity.

Po krystalizaci ze směsi EtOH a CHCl₃ (1:1) bylo získáno 35 mg látky LM-5.1, která byla spojena s dalšími frakcemi obsahující stejnou látku a podrobena dalšímu přečištění. Hmotnost spojených frakcí látky LM-5.1 byla 60,4 mg.

Spojené frakce látky LM-5.1 byly přečištěny na komerčních deskách Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck) a jako mobilní fáze byla použita cykloHx-aceton-NH₃ (50:5:1). Získali jsme podfrakce LM-5.1.1 a LM-5.1.2 a po krystalizaci ze směsi EtOH a CHCl₃ (1:1) bylo získáno 21 mg látky LM-5.1.2.

Třetí podfrakce, tedy látka LM-5.3 nebyla alkaloidního charakteru.



Obr. č. 27: LM-5.1 s nečistotou, Minovincin – Minovin - 1 – LM-5.1 s nečistotou

4.5 GC/MS analýza a identifikace alkaloidů

Pro identifikaci alkaloidů byla využita metoda plynová chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru. Struktura jednotlivých alkaloidů byla zjišťována pomocí chromatografu Agilent Technologies 7890A s Triple-Axis hmotnostním detektorem Agilent Technologies 5975C.

Podmínky:

Kolona: Agilent Technologies HP5-MS (30 m x 0,250 mm)

Nosný plyn: hélium 5.0 (Linde), 0,8 ml/min

Detektor: hmotnostní spektrometr

Teplota kolony: teplotní program 15 °C/min od 100 °C do 180 °C, 5 °C/min od 180 °C do 300 °C, 40 min na 300 °C

Zkoušený roztok: roztok alkaloidního extraktu 1 mg/ml

Nástřík: při 280 °C v objemu 1µl roztoku alkaloidního extraktu a split v poměru 15:1

Ionizace proběhla při teplotě 230 °C elektrony 70 eV. Detekované fragmenty byly v rozmezí 40 – 600 m/z. Získaná spektra izolovaných alkaloidů se porovnála se spektry nalezenými v komerční knihovně spekter NIST 11 (National institut of Standards and Technology Library, USA) a daty, která byla uvedena v literatuře.

4.6 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity alkaloidů

4.6.1 Materiál a chemikálie

4.6.1.1 Chemikálie

10mM roztok Acetylthiocholin jodidu (Sigma-Adrich)

10mM roztok Butyrylthiocholin jodidu (Sigma-Adrich)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Adrich)

5mM roztok 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny ≥ 98% (Sigma-Aldrich)

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

4.6.1.2 Pufry

5mM Fosfátový pufr, pH 7,4

Zásobní roztok A

10 mM roztok NaH_2PO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,20 g NaH_2PO_4 , nebo 1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, nebo 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

Zásobní roztok B

10 mM roztok Na_2HPO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,42 g Na_2HPO_4 , nebo 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, nebo 3,58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).

Smíchá se 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody.

5mM Fosfátový pufr obsahující 150 mM chloridu sodného, pH 7,4

8,766 g chloridu sodného p. a. se rozpustí v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a doplní se jím do 1000 ml.

100mM Fosfátový pufr, pH 7,4

Zásobní roztok A

200 mM roztok NaH_2PO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 24,0 g NaH_2PO_4 , nebo 27,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, nebo 31,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

Zásobní roztok B

200 mM roztok Na_2HPO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 28,4 g Na_2HPO_4 , nebo 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, nebo 71,63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).

Smíchá se 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody.

4.6.1.3 Biologický materiál

Zdroj lidské acetylcholinesterasy (AChE) – hemolyzát lidských erytrocytů

Zdroj lidské butyrylcholinesterasy (BuChE) – lidská plazma

4.6.1.4 Přístroje

Reader Synergy™ HT Multi. Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

4.6.2 Příprava hemolyzátu lidských erytrocytů a plazmy

Hemolyzát erytrocytů byl připraven z čerstvě odebrané krve zdravých dobrovolníků, ke které byly přidány 2 ml citranu sodného na 18 ml krve proti srážení. Suspenze byla rozdělena do zkumavek a podrobena centrifugací (4 °C, 10 min, 4000 otáček/min). Oddělená plazma od ostatních složek krve se odsála a takto byla připravena pro stanovení aktivity BuChE.

Erytrocytární suspenze byla následně třikrát promyta 5 mM fosfátovým pufrům (pH 7,4), obsahující chlorid sodný a následně opět podrobena centrifugací (4 °C, 10 min, 12000 otáček/min). Přidaný pufr byl nejprve odsán a erytrocyty poté smíchány s 5 mM fosfátovým pufrům (pH 7,4) tak, aby 1 ml erytrocytů připadal na 35 – 40 ml pufru. Připravená suspenze se míchala po dobu 10 minut na magnetické míchačce, čímž došlo k spontánní lýze erytrocytů, a takto byl hemolyzát připraven pro stanovení aktivity vůči AChE.

4.6.3 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC₅₀)

Hodnoty IC₅₀ byly stanoveny Ellmanovou spektrofotometrickou metodou s použitím 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Jako substrát byly použity estery thiocholinu, které jsou štěpeny esterasami na thiocholin a příslušnou kyselinu za vzniku žlutě zbarvených produktů. Poté se sledoval nárůst absorbance za 1 minutu při teplotě 37 °C a dané vlnové délce (AChE 436 nm a BuChE 412 nm).

Pro stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity IC₅₀ izolovaných látek se do mikrotitračních destiček napipetuje 8,3 μl lidské plazmy (BuChE) nebo hemolyzátu lidských erytrocytů (AChE), přidá se 283 μl DTNB a 8,3 μl roztoku izolovaných látek v dimethylsulfoxidu v klesající koncentraci 40,0; 10,0; 4,0; 1,0; 0,4 mM. Poté se přidá roztok substrátu a po 2 minutách se odečtou naměřené absorbance.

Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE a BuChE nelineární regrese pomocí programu GraphPad Prism. Byl stanoven průměr se směrodatnou odchylkou. Získané hodnoty cholinesterasové inhibiční aktivity se poté porovnávaly s hodnotami IC₅₀ referenčních látek (galanthamin, huperzin A a eserin).

Procenta inhibice (% I) se počítají podle vzorce:

$$\% I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) \times 100$$

ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu

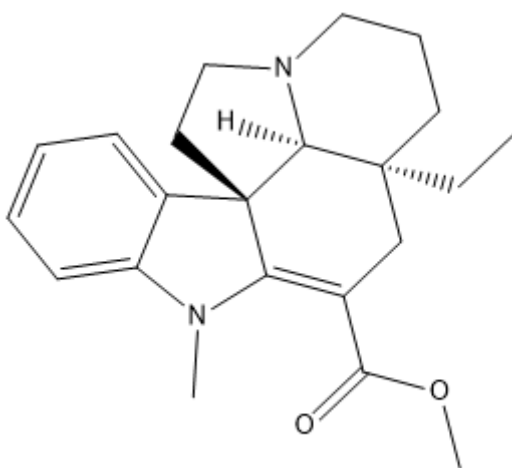
ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku

5 Výsledky

5.1 Identifikace látky LM-5.1.2

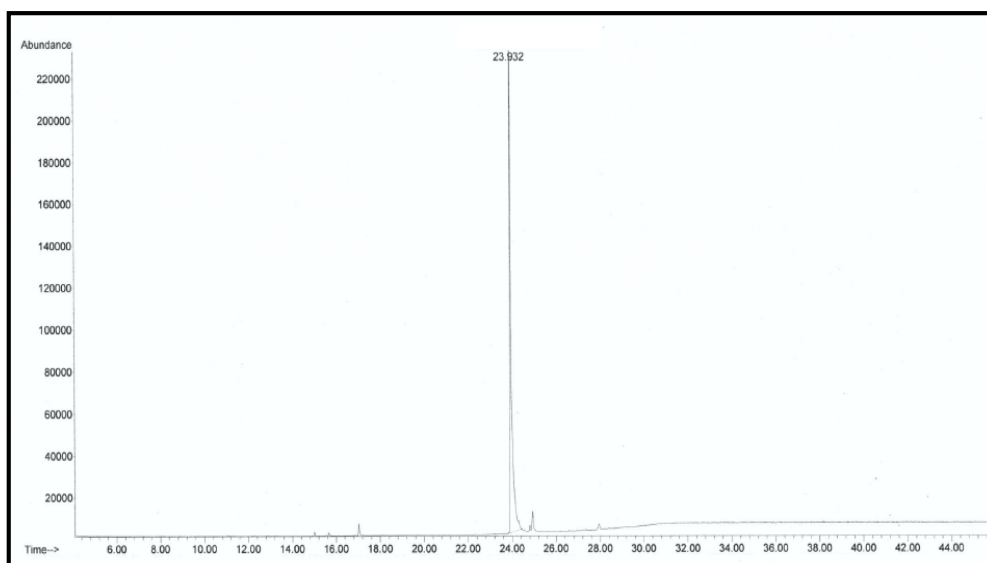
Látka 5.1.2 byla pomocí GC/MS analýzy identifikována jako (-)-minovin. Procentuální shoda se spektrem (-)-minovinu v knihovně NIST 11 byla 88,2 %. Retenční čas píku je 23,932 minut.

CAS: 19074-77-2

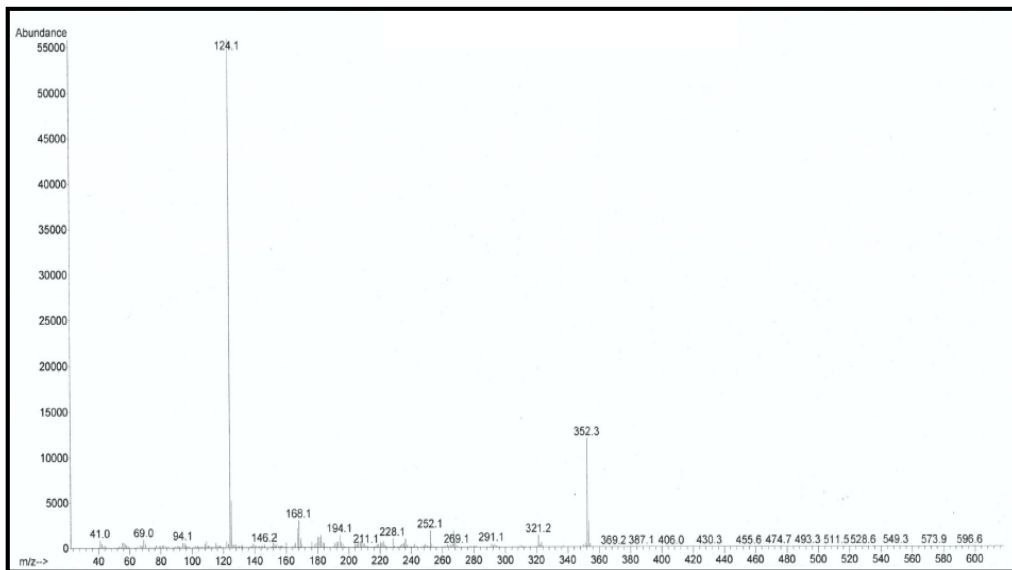


Obr. č. 28: Vzorec (-)-minovinu

5.1.1 GC/MS analýza LM-5.1.2



Obr. č. 29: Chromatogram (-)-minovinu



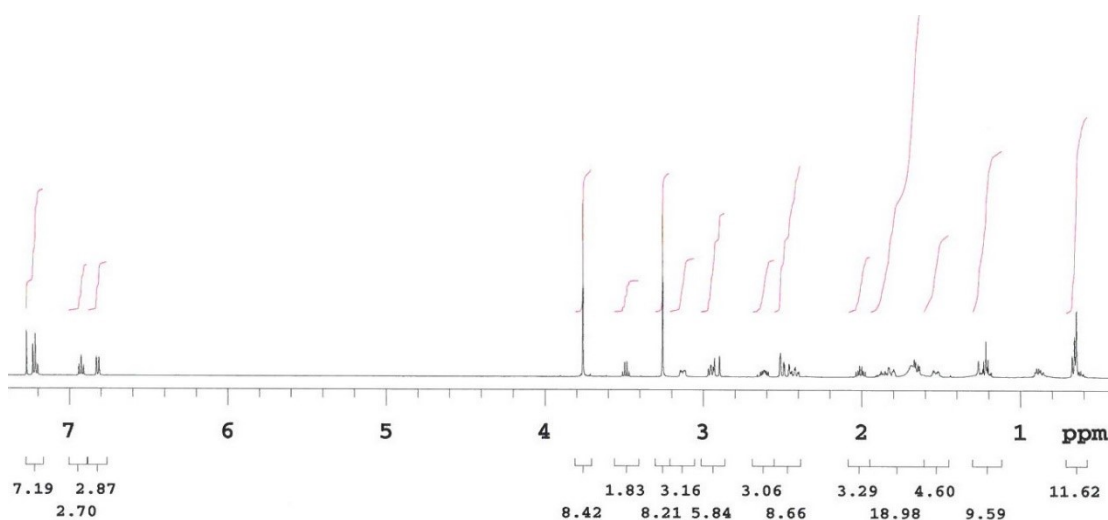
Obr. č. 30: MS spektrum (-)-minovinu

EI-MS m/z [M^+] 124 (100), 352 (213), 125 (93), 168 (54), 353 (52), 167 (39), 252 (32), 182 (25)

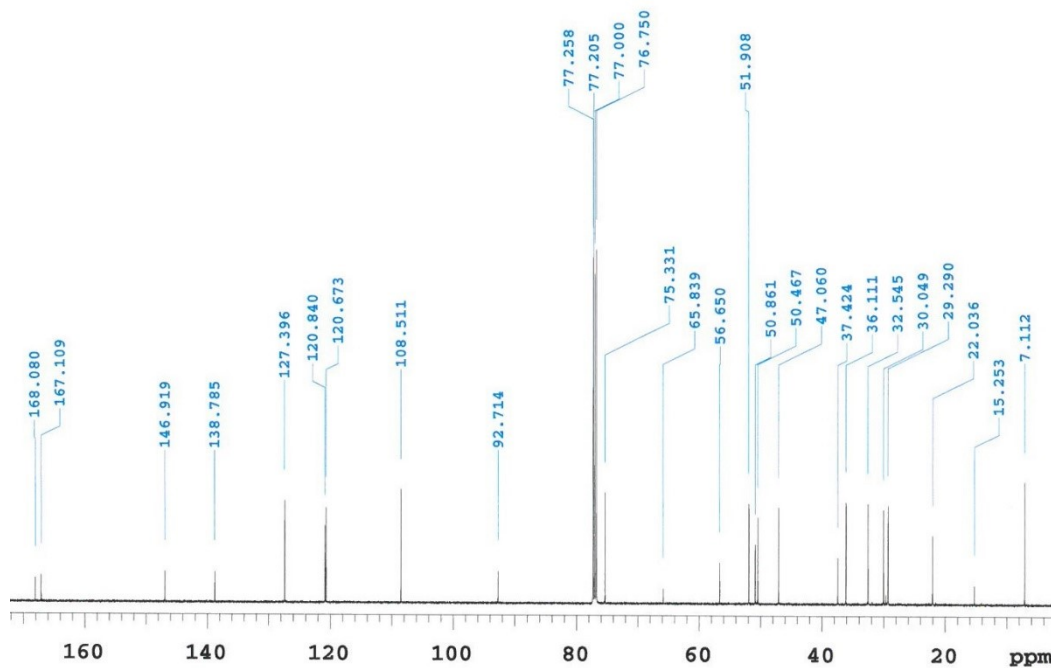
5.1.2 NMR analýza látky 5.1.2

NMR spektra byla naměřena nad rámec mé diplomové práce na Katedře anorganické a organické chemie.

^1H NMR



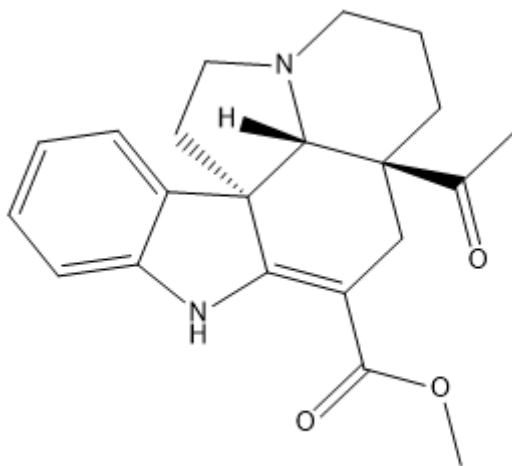
^{13}C NMR



5.2 Identifikace látky LM-5.2

Látka 5.2 byla identifikována pomocí NMR jako (+)-minovincin. U této látky nebylo možné provést GC/MS analýzu. Látka nebyla dostatečně těkavá.

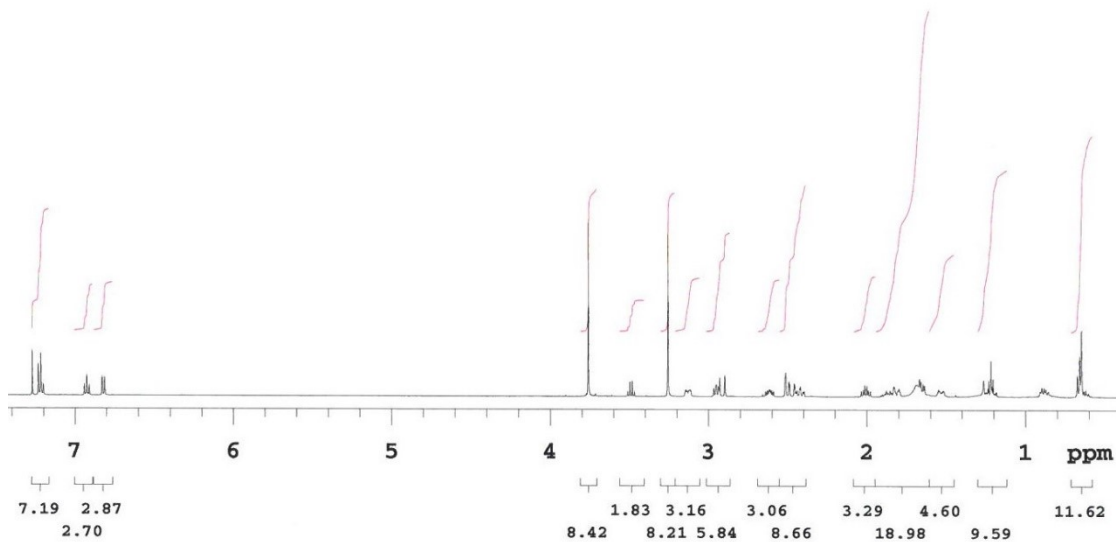
CAS: 15622-69-2



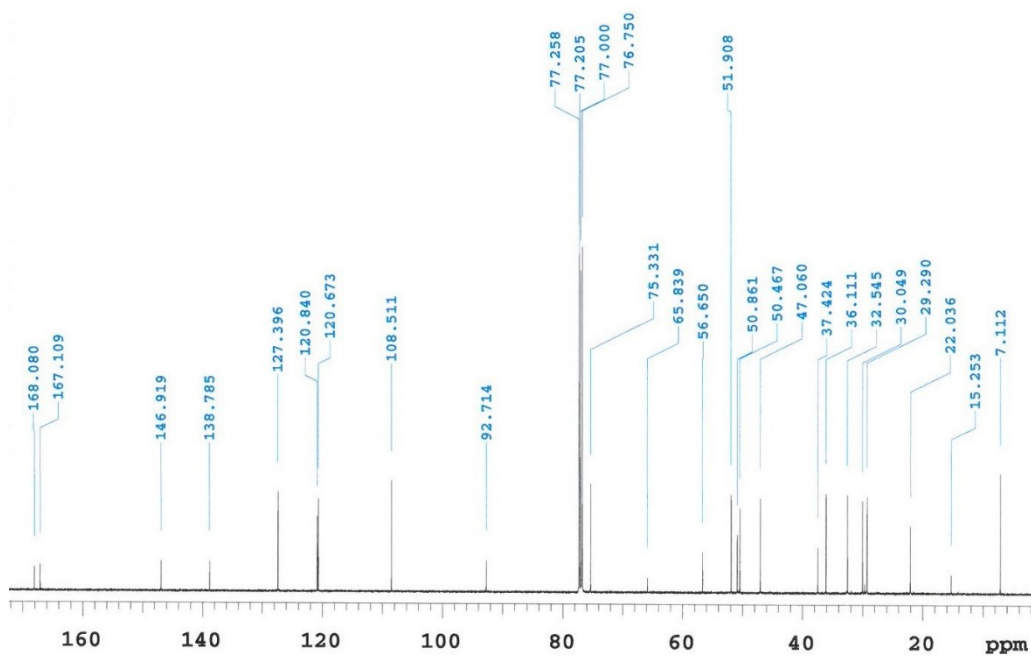
Obr. č. 31: MS spektrum (+)-minovincinu

5.2.1 NMR analýza látky LM-5.2

^1H NMR



^{13}C NMR



5.3 Stanovení inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů

Látka	AChE (μM)	BuChE (μM)
Minovin	$234,27 \pm 63,40$	$26,32 \pm 2,52$
Minovincin	> 1000	$655,05 \pm 35,37$
Standardy		
Galanthamin	$1,710 \pm 0,065$	$42,30 \pm 1,30$
Huperzin A	$0,033 \pm 0,001$	> 1000
Eserin	$0,063 \pm 0,001$	$0,130 \pm 0,004$

6 Diskuse

V rámci této diplomové práce byla zpracována frakce 128-146 velkého extraktu. Následně byly izolovány a identifikovány dvě látky. Látka LM-5.2 byla identifikována jako (+)-minovincin a látka LM-5.1.2 jako (-)-minovin. Tyto dvě látky byly poté podrobeny zkouškám inhibiční aktivity na lidské enzymy AChE a BuChE a porovnány se standardy. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda získané alkaloidy jsou vhodné pro další zkoumání a mohly by být potenciálně využity v terapii Alzheimerovy choroby.

(+)-Minovincin nevykazoval signifikantní inhibiční aktivitu ani k jednomu z enzymů. (IC_{50} (AChE) = > 1000 μ M a IC_{50} (BuChE) = 655,05 \pm 35,37 μ M). (-)-Minovin nejevil známky inhibiční aktivity vůči AChE (IC_{50} = 234,27 \pm 63,40 μ M), ale inhibiční aktivita vůči enzymu BuChE byla znatelně vyšší (IC_{50} = 26,32 \pm 2,52 μ M). I přesto je ale aktivita (-)-minovinu poměrně nevýznamná.

Z důvodu značného využívání indolových alkaloidů v medicíně, byly alkaloidy (-)-minovin i (+)-minovincin studovány pro svou komplexní pentacyklickou strukturu z hlediska jejich syntézy.[53][54]

V literatuře byl alkaloidní extrakt rostliny *Vinca minor* L. zkoumán pro jeho anticholinesterasovou aktivitu také Ellmanovou metodou. Alkaloidní extrakt *Vinca minor* L. vykazoval srovnatelnou aktivitu vůči BuChE jako galanthamin, vůči AChE působil méně.[55]

7 Seznam použité literatury

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Dementia: a public health priority* [online]. Geneva: World Health Organization, 2012. ISBN 978-924-1564-458. Dostupné z: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75263/9789241564458_eng.pdf;jsessionid=51E81E1DD77F986CA539566DAFB9DA78?sequence=1 staženo: 1. 4. 2018
- [2] Perez-Ruiz E., Decrop D., Ven K., Tripodi L., Leirs K., Rosseels J., van de Wouwer M., Geukens N., De Vos A., Vanmechelen E., Windericksx J., Lammertyn J., Spasic D.: *Digital ELISA for the quantification of attomolar concentrations of Alzheimer's disease biomarker protein Tau in biological samples*. *Anal. Chim. Acta.* 74, 1015 (2018)
- [3] <https://portal.faf.cuni.cz/Groups/ADINACO/> staženo: 1. 4. 2018
- [4] Almagro L., Fernández-Pérez F. a Pedreno M.: *Indole Alkaloids from Catharanthus roseus: Bioproduction and Their Effect on Human Health*. *Molecules.* 20(2), 2973-3000 (2015)
- [5] Chen Qi, Xueyan Lu, Xiaorui Guo, Qingxi Guo, Dewen Li a Hejcman M.: *Metabolomics Characterization of Two Apocynaceae Plants, Catharanthus roseus and Vinca minor, Using GC-MS and LC-MS Methods in Combination*. *Molecules.* 22(6), 997 (2017) Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/6/997>
- [6] Grimley E. J., Wilcock G. a Birks J.: *Evidence-based pharmacotherapy of Alzheimer's disease*. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 7(3), 351 (1999) Dostupný z: <https://academic.oup.com/ijnp/article/7/3/351/681903>
- [7] Anand A, Patience A. A., Sharma N. a Khurana N.: *The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer's disease: A comprehensive review*. *Eur. J. Pharmacol.* 364 (2017) Dostupné z: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299917306271?via%3Dihub

- [8] <http://www.alzheimer.cz/> staženo: 25. 12. 2017
- [9] Budson A. E. a Konwall N. W.: *The handbook of Alzheimer's disease and other dementias*. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK 2011
- [10] Mačák J., Mačáková J. a Dvoráčková J.: *Patologie*. 2., dopl. Vyd. Grada, Praha 2012.
- [11] Ludovic M. (Ed): *Why looking at the whole hippocampus is not enough – a critical role for anteroposterior axis, subfield and activation analyses to enhance predictive value of hippocampal changes for Alzheimer's disease diagnosis*. Front. Cell. Neurosci. Vol. 8 (2014) Dostupné z:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00095/abstract>
- [12] De La Monte S. (Ed): *Alzheimer's Disease Pathogenesis-Core Concepts, Shifting Paradigms and Therapeutic Targets*. InTech (2011)
- [13] Koukolík F. a Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Grada, Praha 1998
- [14] Huether S. E.: *Understanding pathophysiology*. 5th ed., Elsevier, St. Louis 2012
- [15] Ludovic M. (Ed): *A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions*. Front. Cell. Neurosci. Vol. 8 2014 Dostupné z:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00084/abstract>
- [16] Weinstock M.: *The Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease Based on the Cholinergic Hypothesis: an Update* Neurodegeneration 349 (1995)
- [17] Jiráček R.: *Farmakoterapie Alzheimerovy choroby*. Praktické lékařství 107 (2012)(3)
- [18] Jiráček R.: *Farmakoterapie Alzheimerovy choroby*. Praktické lékařství 176 (2009)(4)

- [19] Ludovic M. (Ed): *What new directions for Alzheimer's disease?: Insulin dysfunction and Tau pathology*. Front. Cell. Neurosci Vol. 8 (2014) Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2014.00022/full>
- [20] Chmátalová Z. a Skoumalová A.: *Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky*. Klin. Biochem. Metab. 189 22(43) (2014)
- [21] Marková E., Veglářová M. a Babiaková M.: *Psychiatrická ošetrovatelská péče*. 5th ed. Grada, Praha 2006
- [22] Lincová D., Farghali H. a Babiaková M.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Galén, Praha 2007
- [23] <http://www.sukl.cz> staženo: 25. 12. 2017
- [24] Doležal M. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Karolinum, Praha 2013
- [25] Jahodář L. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Vyd. 3., upr. a dopl. Karolinum, Praha 2011
- [26] Opletal L., Koula V.: <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=6> staženo: 14. 11. 2017
- [27] Wong, S.K., Lim Yau a Chan E.: *Botany, uses, phytochemistry and pharmacology of selected Apocynaceae species: A review*. Pharmcogn. Commun. Vol. 3 2013
- [28] Slavík B. a Štěpánková J. (Ed.): *Květena České republiky*. Academia, Praha 2011
- [29] <http://www.andalucia.com/environment/wildflowers/periwinkle-vinca-diformis.htm> staženo: 25.12. 2017

- [30] <http://chalksteppe.org/en/flora-and-fauna/species/vinca-herbacea.html>
staženo: 25. 12. 2017
- [31] <http://www.plantarium.ru/page/image/id/167166.html>
<http://www.plantarium.ru/page/image/id/232144.html> staženo: 25. 12. 2017
- [32] <https://gobotany.newenglandwild.org/species/vinca/major/> staženo: 25. 12. 2017
- [33] <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10024> 25. 12. 2017
- [34] Čepková Hlásná P., Karlík P., Viehmannová I., Mullerová V., Šmejda L. a Hejcman M.: *Genetic and leaf-trait variability of Vinca minor at ancient and recent localities in Central Europe*. *Biochem. Syst. Ecol.* 22 (64) (2016)
- [35] <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=140> staženo: 27. 12. 2017
- [36] Korbelař J. *Naše rostliny v lékařství*. Avicenum, Praha 1985
- [37] Spilková J. *Farmakognozie* Karolinum, Praha 2016
- [38] Farahanikia B., Akbarzadeh T., Jahangirzadeh A., Yassa N., Ardekani M. R. S., Mirnezami T., Hadjiakhoondi A. a Khanavi M.: *Phytochemical Investigation of Vinca minor Cultivated in Iran*. *Iran. J. Pharm. Res.* (10) 777 (2011) Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3813059/>
- [39] Ziegler J. a Fachini P. J.. *Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59(1), 735 (2008)
- [40] <http://www.epharmacognosy.com/2012/07/alkaloids-derived-from-tryptophan.html> staženo: 27. 12. 2017
- [41] LIU, L.: *Biogenetically patterned synthesis of monoterpenoid indole alkaloids from secologanin and its derivatives*. *Chinese Journal of Organic Chemistry abstract* (2003) dostupné z: Web of science

- [42] Levac D., Cázares P., Fang YU a De Luca V.: *A Picrinine N -Methyltransferase Belongs to a New Family of γ -Tocopherol-Like Methyltransferases Found in Medicinal Plants That Make Biologically Active Monoterpenoid Indole Alkaloids.* *Plant Physiology* 170(4), 1935 (2016)
- [43] Taylor W. I. a Farnsworth N.: *The Vinca Alkaloids: botany, chemistry and pharmacology.* Marcel Dekker, New York 1973
- [44] Malikov V.M. a Yunusov S. Yu: *Vinca alkaloids. Chemistry of Natural Compounds* 597 (1977) Dostupné z:
<https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00569574?LI=true>
- [45] Proksa, B. a Grossmann E.. *High performance liquid chromatographic determination of alkaloids from Vinca minor L.* *Phytochem. Anal. Abstrakt* 2(2), 74 (1991)
- [46] Zhang Yi-shuai, Li Jian-dong a Yan Chen: *An update on vinpocetine: New discoveries and clinical implications.* *Eur. J. Pharmacol.* 819 30. (2018)
- [47] Li-Rong Wu, Liang Liu, Xiao-Yi Xiong, Qin Zhang, Fa-Xiang Wang, Chang-Xiong Gong, Qi Zhong, Yuan-Rui Yang, Zhao-You Meng and Qing-Wu Yang: *Vinpocetine alleviate cerebral ischemia/reperfusion injury by down-regulating TLR4/MyD88/NF- κ B signaling.* *Oncotargets* 8(46) 80315 (2017)
- [48] Wu MP., Zhang YS., Xu XB., Zhou Q., Li JD. a Yan C., *Vinpocetine Attenuates Pathological Cardiac Remodeling by Inhibiting Cardiac Hypertrophy and Fibrosis.* *Cardiovas. Drugs Ther.* 31(2), 157 (2017)
- [49] Tomko J.: *Farmakognózia: učebnica pre farmaceutické fakulty. 2., opr. vyd.:* Osveta, Martin, 1999
- [50] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Catharanthus_roseus_Bain_fleur.jp
g staženo: 11. 3. 2018

- [51] Al-zahrani Mobark H. S., Elbeshehy Fahmi E. K., Aldhebiani A. Y. a Elbeaino T. *Effect of Cucumber mosaic virus (CMV) infection on antineoplastic alkaloids from periwinkle (Catharanthus roseus L.) cultured in the Mecca region and resistance induction by plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR)* Biotechnol. Equip. 32(1), 49 (2017)
- [52] Štalmach V. *Nie je vinca ako vinca: Príbeh katarantu rúžového.* Liečivé rastliny. (5) 168 (2012)
- [53] Morikawa T., Harada S. and Nishida A.: *Chiral Holmium Complex-Catalyzed Synthesis of Hydrocarbazole from Siloxyvinylindole and Its Application to the Enantioselective Total Synthesis of (-)-Minovincine.* The J. Org. Chem. 8859 (2015)
- [54] Zhong Qing Yuan, Hayato Ishikawa, and Boger D. L.: *Total Synthesis of Natural (-)- and ent-(+)-4-Desacetoxy-6,7-dihydrovindorosine and Natural and ent-Minovine: Oxadiazole Tandem Intramolecular Diels-Alder/1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction.* Org. Lett. Vol. 7, 741 (2005)
- [55] Bahadori F., Topcu G., Boga M., Turkecul A., Kolak U. and Kartal M.: *Indole Alkaloids from Vinca major and V. minor Growing in Turkey.* Nat. Prod. Commun. Vol.7 731 (2012)

ABSTRAKT

Marečková, L.: Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin VII. Alkaloidy *Vinca minor* L. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2018

Nejprve byl připraven extrakt z nati rostliny *Vinca minor* L., který se následně dělil pomocí sloupcové chromatografie na jednotlivé frakce. Vybraná frakce byla následně dělena metodou TLC na silikagelu. Byly izolovány dvě látky, které se metodou GC/MS a NMR identifikovaly jako (-)-minovin a (+)-minovincin, a obě látky se následně podrobily zkouškám inhibiční aktivity enzymů lidské acetylcholinesterasy (hemolyzát lidských erytrocytů) a butyrylcholinesterasy (lidská plasma). Jako standardy pro porovnání inhibičních aktivit se použil Galanthamin, Huperzin A a Eserin. (+)-Minovincin nevykazoval významné inhibiční aktivity ani k jednomu z enzymů ($IC_{50} = AChE > 1000 \mu M$, $BuChE 655,05 \pm 35,37 \mu M$) a není tedy vhodný pro další zkoumání. (-)-Minovin nevykazoval výjimečnou aktivitu vůči AChE ($IC_{50} = 234,27 \pm 63,40 \mu M$), aktivita vůči BuChE ($IC_{50} = 26,32 \pm 2,52 \mu M$) byla vyšší než u Galanthaminu, ale stále relativně nízká pro další zkoumání. Cílem této práce byl především výběr vhodných alkaloidů *Vinca minor* L., které by mohly být potenciálně významné v léčbě Alzheimerovy choroby.

Klíčová slova: *Vinca minor* L., Alzheimerova choroba, cholinesterasa, indolové alkaloidy, minovin, minovincin

ABSTRACT

Marečková, L. : Biological activity of secondary plant metabolites VII. Alkaloids of *Vinca minor* L. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Hradec Králové, Department of pharmaceutical botany, Hradec Králové 2018

There was prepared an extract from aerial parts of the plant *Vinca minor* L. This prepared extract was separated by the column chromatography into individual fractions. One chosen fraction was separated by TLC on silicagel. Two substances were isolated and they were identified by GC/MS and NMR as (-)-minovin and (+)-minovincin. These two substances were tested for their inhibition activity against human acetylcholinesterase (hemolysate of human erythrocytes) and butyrylcholinesterase (human plasma). Their inhibition activity was compared to standards which were Galanthamin, Huperzin A and Eserin. (+)-Minovincin did not show significant inhibitory activity against either enzyme ($IC_{50} = AChE > 1000 \mu M$, $BuChE 655,05 \pm 35,37 \mu M$) and it is not suitable for further investigation. (-)-Minovin showed no significant activity against AChE ($IC_{50} = 234,27 \pm 63,40 \mu M$), activity against BuChE ($IC_{50} = 26,32 \pm 2,52 \mu M$) was higher than inhibitory activity of Galanthamin, but still relatively low for further investigation. The aim of this work was mainly the selection of suitable *Vinca minor* L. alkaloids, which could potentially be relevant in the treatment of Alzheimer's disease.

Key words: *Vinca minor* L., Alzheimer's disease, cholinesterase, indole alkaloids, minovin, minovincin